

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

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume № / No.

25

3

2025

ТЕМА НОМЕРА

Рекомбинантные терапевтические белки



www.biopreparations.ru



Уважаемые коллеги!

Рекомбинантные терапевтические белки, получаемые методами генной инженерии, стали одним из ключевых драйверов трансформации современной биотехнологии и медицины. Эти белки, продуцируемые с помощью введения рекомбинантной ДНК в клетки-хозяева, кардинально изменили лечение многих хронических заболеваний, таких как диабет, рак и аутоиммунные расстройства. Терапевтические белки нашли применение при разработке новых лекарств, средств диагностики и вакцинных препаратов.

Всего лишь в 1978 году был разработан первый генно-инженерный лекарственный препарат – рекомбинантный человеческий инсулин, продуцируемый бактерией *Escherichia coli*. В 1986 году первым терапевтическим белком, полученным в клетках млекопитающих, стал активатор тканевого плазминогена человека (тромболитический препарат алтеплаза). В настоящее время системы экспрессии на основе культивируемых клеток млекопитающих наиболее

распространены для получения около 70% терапевтических рекомбинантных белков. Использование интенсивных технологий культивирования в биореакторах, эффективных питательных сред и ростовых добавок, а также контрольных стратегий и новых подходов к разработке клеточных линий-продуцентов лежит в основе современных биотехнологических производств лекарственных препаратов. По разным оценкам, в разработке находится около тысячи кандидатных препаратов.

Именно рекомбинантные белки, на долю которых приходится больше половины всех одобренных биологических лекарственных средств, составляют основу многих биофармацевтических препаратов. Это связано как с развитием персонализированной медицины, так и с технологическими инновациями, в том числе и использованием искусственного интеллекта, интеграцией цифровых технологий, стабильным производством и глобализацией доступа к терапии.

Вместе с тем остаются нерешенные проблемы, обусловленные как высокими затратами на разработку и производство рекомбинантных терапевтических белков, так и связанными с оценкой их иммуногенности и безопасности. Неслучайно данный тематический выпуск журнала «БИОпрепараты...» посвящен именно этим актуальным вопросам, отвечая на существующие вызовы и формируя общие методические подходы к получению клеточных линий-продуцентов рекомбинантных терапевтических белков, выявлению антилекарственных антител, оптимизации процессов стандартизации и валидации методов контроля.

Уверен, что статьи данного выпуска журнала помогут читателям получить ответы для решения прикладных задач, связанных с разработкой и оценкой качества рекомбинантных терапевтических белков.

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

ХАМИТОВ Равиль Авгатович

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

ТОМ 25, № 3, 2025

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 Единый государственный перечень научных изданий (ЕГПНИ) – «Белый список» (уровень 2), а также в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и на соискание ученой степени доктора наук. Журнал принимает статьи по следующим научным специальностям: биотехнология, молекулярная биология, вирусология, микробиология, аллергология и иммунология.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 0,766.

Журнал индексируется в базах данных: Scopus, 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 статей и рецензирование рукописей не взимается.

Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International CC BY 4.0.

VOLUME 25, NO. 3, 2025

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 Unified State List of Scientific Publications (“White List”) and 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 0.766.

The journal is indexed in the following databases: Scopus, 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 articles and reviewing manuscripts.

The content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International licence (CC BY 4.0).

На обложке: Молекулярная модель гуманизированного антитела пембролизумаба, 3D-изображение (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX388688604/>)

Cover image: Molecular model of pembrolizumab, a humanized antibody, 3D illustration (a licensed image from the Photogenica image bank <https://photogenica.ru/zoom/PHX388688604/>)

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

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия)

Хаитов Муса Рахимович, д-р мед. наук, проф., академик 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)

Акоста Бас Кармен, PhD, проф., Latinoамериканский институт биотехнологий «Мечников» (Манагуа, Никарагуа)

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

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Москва, 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 «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» (Минск, Республика Беларусь)

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

Дмитриев Игорь Павлович, канд. биол. наук, Университет Вашингтона в Сент-Луисе (Сент-Луис, штат Миссури, США)

Иванов Вячеслав Борисович, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия)

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

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук, ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (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, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» 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. (Москва, Россия)

Мосягин Вячеслав Дмитриевич, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия)

Смит Елена, канд. биол. наук, Центр передовых мРНК-технологий Санофи (Бостон, штат Массачусетс, США)

Фадеекина Ольга Васильевна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

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

Шустов Александр Вячеславович, канд. биол. наук, Национальный центр биотехнологии (Астана, Казахстан)

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.

Научные редакторы

Гукасова Надежда Вадимовна,
канд. биол. наук
Ершов Павел Викторович,
канд. биол. наук

Редактор

Калиничев Сергей Анатольевич,
канд. фарм. наук

Редактор перевода

Агафоновичева Тамара Владимировна

Менеджер по развитию

Мжелский Александр Анатольевич

**Адрес учредителя, издателя
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

100 экз. Цена свободная

Подписано в печать

25.09.2025

Дата выхода в свет

10.10.2025

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,
2025

СОДЕРЖАНИЕ

Тема номера:

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ

С.С. Тимонова, И.А. Кирик, М.А. Филатова, А.И. Анфилатова,
С.С. Шубина, А.А. Полупанова, А.Ф. Габдрахманова, Е.С. Иванов,
В.Н. Бадэ, А.А. Пискунов, Р.А. Хамитов

**Разработка клеточных линий-продуцентов рекомбинантных
терапевтических белков на примере деносумаба.....245**

Е.А. Буслаева, З.Р. Хасаншина, И.А. Корнаков, М.П. Коробкина,
В.И. Шмурак, Р.В. Драйд

**Промоторы для высокоэффективной экспрессии и секреции
проинсулина в *Saccharomyces cerevisiae*258**

А.А. Агафонова, М.В. Жилыева, И.В. Лягоскин, А.А. Казаров,
А.Е. Лисова, Р.Р. Шукуров

**Валидация методики на основе биослойной интерферометрии
для определения связывающих (общих) антител
к ромиплостиму в сыворотке крови человека.....271**

И.В. Шевченко, А.Е. Лисова, А.А. Агафонова, К.А. Смолова,
И.М. Алаева, И.Ю. Жуков, А.А. Казаров, И.В. Лягоскин

**Определение антилекарственных антител
к афлиберцепту методом иммуноферментного анализа:
разработка и валидация методики284**

СТАНДАРТИЗАЦИЯ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

О.А. Демидова, О.Г. Корнилова, В.Л. Багирова

**Стандартизация лекарственных препаратов иммуноглобулинов
человека: гармонизация Государственной фармакопеи
Российской Федерации с мировыми стандартами качества296**

А.С. Минеро, О.Б. Рунова, И.М. Щербаченко, О.Б. Устинникова

**Вспомогательные вещества в составе биологических
лекарственных препаратов: функциональная классификация,
проблемы стабильности, аналитические подходы
к определению307**

А.А. Воропаев, О.В. Фадейкина, Р.М. Валюхова, Ю.И. Крысанова,
Д.С. Давыдов, С.В. Овсиенко

**Сравнительная оценка контроля качества питательных сред
с использованием лиофилизированных тест-штаммов
«ЛИОШТАММ»: результаты межлабораторных испытаний321**

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ
ВИРУСОВ**

О.П. Логинова, Н.И. Шевченко, А.В. Воропаева, Е.Л. Гасич

**Распространенность и генотипическая характеристика
вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска
в Гомельской области: результаты скрининга 11382 женщин
за 2018–2023 гг.332**

КЛЕТОЧНАЯ И ЭКЗОСОМАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

А.И. Куралесова, А.Г. Грошева, Е.Н. Генкина, И.Б. Есмагамбетов

**Экзосомы, продуцируемые мезенхимальными
стромальными клетками, для терапии острого
респираторного дистресс-синдрома:
обзор доклинических и клинических исследований343**

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Editor-in-Chief

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

Deputy Editors-in-Chief

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

Musa R. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. RAS, National Research Centre "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, and gene therapy products, human and animal blood plasma products, as well as various groups of immunomodulatory and cell-based medicinal 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)

Carmen Acosta Bas, PhD (Health Sci.), Prof., Latin-American Institute of Biotechnology MECHNIKOV (Managua, Nicaragua)

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)

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)

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

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

Nikolay I. Briko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. 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 Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health (Minsk, Republic of Belarus)

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

Igor P. Dmitriev, Cand. Sci. (Biol.), Washington University in St. Louis (Saint Louis, Missouri, United States)

Vyacheslav B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Prof. (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.), I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (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 Y. Logunov, Dr. Sci. (Biol.), Acad. RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (Moscow, Russia)

Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Vyacheslav D. Mosyagin, Dr. Sci. (Med.), Prof. (Moscow, Russia)

Elena Smith, Cand. Sci. (Biol.), Sanofi's mRNA Center of Excellence (Boston, Massachusetts, United States)

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

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

Alexandr V. Shustov, Cand. Sci. (Biol.), National Center for Biotechnology (Astana, Kazakhstan)

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 Editors

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

Pavel V. Ershov, Cand. Sci. (Biol.)

Editor

Sergey A. Kalinichev, Cand. Sci. (Pharm.)

Translation Editor

Tamara V. Agafonycheva

Development Manager

Alexander A. Mzhelsky

Postal address of the founder, publisher, 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

100 copies. Free price

Passed for printing

25 September 2025

Date of publication

10 October 2025

Subscription codes

Pressa Rossii catalogue: 57941

Ural-Press agency catalogue: 57941

The journal is registered as a mass
medium 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, 2025

CONTENTS

Issue topic

RECOMBINANT THERAPEUTIC PROTEINS

S.S. Timonova, I.A. Kirik, M.A. Filatova, A.I. Anfilatova,
S.S. Shubina, A.A. Polupanova, A.F. Gabdrakhmanova, E.S. Ivanov,
V.N. Bade, A.A. Piskunov, R.A. Khamitov
**Development of cell lines producing recombinant therapeutic
proteins, with denosumab as a case study**.....245

E.A. Buslaeva, Z.R. Khasanshina, I.A. Kornakov, M.P. Korobkina,
V.I. Shmurak, R.V. Drai
**Promoters for high-efficiency expression and proinsulin
secretion in *Saccharomyces cerevisiae***258

A.A. Agafonova, M.V. Zhilyaeva, I.V. Lyagoskin, A.A. Kazarov,
A.E. Lisova, R.R. Shukurov
**Validation of a biolayer interferometry-based method
for the determination of binding (total) antibodies
to romiplostim in human serum**.....271

I.V. Shevchenko, A.E. Lisova, A.A. Agafonova, K.A. Smolova,
I.M. Alaeva, I.Yu. Zhukov, A.A. Kazarov, I.V. Lyagoskin
**Detection of anti-drug antibodies to aflibercept
by enzyme-linked immunosorbent assay:
Development and validation of the method**284

QUALITY CONTROL AND STANDARDISATION

O.A. Demidova, O.G. Kornilova, V.L. Bagirova
**Standardisation of human immunoglobulin preparations:
Harmonising Russian State pharmacopoeia with world
quality standards**.....296

A.S. Minero, O.B. Rounova, I.M. Shcherbachenko, O.B. Ustinnikova
**Excipients in biological medicinal products:
Functional classification, stability issues,
and analytical quantitation approaches**307

A.A. Voropaev, O.V. Fadeikina, R.M. Valyukhova, Ju.I. Krysanova,
D.S. Davydov, S.V. Ovsienko
**Comparative evaluation of nutrient media quality
control using LYOSHTAMM lyophilised test strains:
Results of interlaboratory trials**.....321

MOLECULAR DIAGNOSTICS AND VIRUS GENOTYPING

V.P. Lohinava, N.I. Shevchenko, A.V. Voropayeva, E.L. Gasich
**Prevalence and genotypic distribution of high-risk human
papilloma virus in Gomel region: Screening results
of 11,382 women over 2018–2023**332

CELL- AND EXOSOME-BASED THERAPIES

A.I. Kuralesova, A.G. Grosheva, E.N. Genkina, I.B. Esmagambetov
**Mesenchymal stromal cell-derived exosomes
for acute respiratory distress syndrome treatment:
A review of preclinical and clinical trials**.....343



Разработка клеточных линий-продуцентов рекомбинантных терапевтических белков на примере деносумаба

С.С. Тимонова✉, И.А. Кирик, М.А. Филатова, А.И. Анфилатова,
С.С. Шубина, А.А. Полупанова, А.Ф. Габдрахманова, Е.С. Иванов,
В.Н. Бадэ, А.А. Пискунов, Р.А. Хамитов

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

✉ Тимонова Софья Сергеевна; timonova1993@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. При создании биотехнологических лекарственных препаратов ключевое значение имеет разработка высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков. Оработка протоколов селекции и подходов для эффективного скрининга линий-продуцентов целевых белков — необходимый этап разработки технологии производства рекомбинантных белков с высоким выходом целевого продукта.

ЦЕЛЬ. Получение высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантного белка деносумаба на основе суспензионной клеточной линии СНО.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Использовалась суспензионная клеточная линия СНО-K1. Для культивирования применялись среды и подпитки без использования сыворотки или других компонентов животного происхождения. Клетки линии СНО трансфицировали плазмидами, содержащими гены легкой и тяжелой цепей деносумаба, с использованием метода электропорации с помощью системы MaxCyte STX. Селекцию трансфицированных клеток проводили с добавлением антибиотиков (гигромицин, генетицин). Моноклональные клеточные линии получали с использованием системы ClonePix FL. Проводили периодическое культивирование с добавлением подпитки и определение концентрации деносумаба методом иммуноферментного анализа (ИФА) в культуральной жидкости для выявления лидерных моноклональных клеточных линий.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Оптимальная концентрация антибиотиков для селекции клеточных линий-продуцентов на основе клеток СНО составила 600 мг/л гигромицина и 600 мг/л генетицина. После проведения трансфекции из 1920 минипулов селекцию прошел 1041 (около 54%). Отбор минипулов-продуцентов деносумаба проводили путем скрининга проб культуральной жидкости с использованием ИФА из 96-, 24- и 6-луночных планшетов. Отобранные 23 лидерных минипула были адаптированы к условиям шейкерного культивирования. С учетом показателей ростовых и продукционных характеристик минипулов определен лидерный минипул (mp-19) с продуктивностью 1,92 г/л (на 7 сут периодического культивирования). На основе mp-19 получены моноклональные клеточные линии-продуценты деносумаба с продуктивностью до 6,5 г/л на 9 сут культивирования с подпиткой.

ВЫВОДЫ. Получены высокопродуктивные моноклональные клеточные линии-продуценты деносумаба. Предложенный подход к созданию клеток-продуцентов может быть применен для получения различных рекомбинантных белков, включая моноклональные антитела, ферменты, факторы свертывания крови.

Ключевые слова: клетки яичника китайского хомячка; СНО; клеточные линии-продуценты; рекомбинантный белок; деносумаб; ИФА; терапевтические моноклональные антитела; биотехнологический лекарственный препарат

Для цитирования: Тимонова С.С., Кирик И.А., Филатова М.А., Анфилатова А.И., Шубина С.С., Полупанова А.А., Габдрахманова А.Ф., Иванов Е.С., Бадэ В.Н., Пискунов А.А., Хамитов Р.А. Разработка клеточных линий-продуцентов рекомбинантных терапевтических белков на примере деносумаба. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):245–257. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-553>

Финансирование. Работа выполнена при финансировании АО «ГЕНЕРИУМ».

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

Development of cell lines producing recombinant therapeutic proteins, with denosumab as a case study

Sofia S. Timonova ✉, Inessa A. Kirik, Maria A. Filatova, Anastasia I. Anfilatova,
Sofia S. Shubina, Anna A. Polupanova, Alina F. Gabdrakhmanova, Evgeny S. Ivanov,
Veronika N. Bade, Aleksandr A. Piskunov, Ravil A. Khamitov

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

✉ Sofia S. Timonova; timonova1993@yandex.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. A key factor in the creation of biotechnological medicinal products is to establish cell lines for high-yield production of recombinant proteins. The development of selection protocols and highly efficient screening approaches for cell lines producing target proteins is a necessary step in the development of recombinant technology for high-yield target protein production.

AIM. This study aimed to derive producer cell lines from a CHO suspension cell line for high-yield production of the recombinant monoclonal antibody denosumab.

MATERIALS AND METHODS. A CHO-K1 suspension cell line was cultured using serum- and animal component-free media and feeds. The cells were transfected with plasmids containing light and heavy chains of denosumab by electroporation using a MaxCyte STX system. The transfected cells were selected under antibiotic pressure (hygromycin and geneticin). Monoclonal cell lines were obtained using a ClonePix FL system. Leader monoclonal cell lines were identified by determining denosumab concentrations by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following fed-batch culture.

RESULTS. The optimum concentrations of antibiotics for the selection of CHO-derived denosumab-producing cell lines were 600 mg/L for hygromycin and 600 mg/L for geneticin. The selection process following transfection was successful in 1041 (about 54%) of 1920 minipools. Denosumab-producing minipools were identified by screening culture fluid samples from 96-, 24-, and 6-well plates using ELISA. Then, 23 leader minipools were chosen and adapted to suspension culture in shaker flasks. The growth and production characteristics of these 23 minipools indicated the leader minipool for cloning (mp-19). This minipool provided a denosumab yield of 1.92 g/L on day 7 of fed-batch culture. Using mp-19, the authors obtained monoclonal cell lines providing up to 6.5 g/L denosumab yields on day 9 of fed-batch culture.

CONCLUSIONS. The authors obtained monoclonal cell lines for high-yield denosumab production. The offered approach to producer cell line development can be applied to the production of various recombinant proteins, including monoclonal antibodies, enzymes, and blood coagulation factors.

Keywords:

Chinese hamster ovary cells; CHO; producer cell lines; recombinant protein; denosumab; ELISA; therapeutic monoclonal antibodies; biotechnological medicinal product

For citation: Timonova S.S., Kirik I.A., Filatova M.A., Anfilatova A.I., Shubina S.S., Polupanova A.A., Gabdrakhmanova A.F., Ivanov E.S., Bade V.N., Piskunov A.A., Khamitov R.A. Development of cell lines producing recombinant therapeutic proteins, with denosumab as a case study. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):245–257. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-553>

Funding. The study was funded by GENERIUM JSC.

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

ВВЕДЕНИЕ

Разработка высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков представляет собой ключевой этап создания биотехнологических лекарственных препаратов [1]. Для достижения высокой экспрессии рекомбинантных белков применяют различные подходы.

Для стабильной интеграции чужеродной ДНК в геном клетки-хозяина необходимо подобрать оптимальный экспрессионный вектор и включить дополнительные генетические элементы, такие как системы селекции, механизмы амплификации генов, участки, обеспечивающие транскрипционную активность, а также гены, регулирующие пролиферацию (например, *bcl-2*, *xiap*, *aven*, *mcl-1*) [2, 3].

Выбор клеточной линии является важным звеном в разработке биотехнологического препарата. Большинство продуктов производятся с использованием эукариотических клеточных линий: клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки мышинной миеломы (NS0 и Sp2/0-Ag14), клетки эмбриональной почки человека (HEK 293), клетки почки сирийского хомячка (ВНК). Выбор клеток эукариотического происхождения обусловлен их способностью синтезировать белки, которые по своей структуре и биохимическим свойствам близки белкам, встречающимся в организме человека [4].

Для крупномасштабного коммерческого производства требуются клеточные линии, способные достигать высоких концентраций жизнеспособных клеток (viable cell density, VCD), что обеспечивает высокую производительность процесса. Важную роль играет оптимизация ростовых сред и подпиток для конкретных клеток-продуцентов, позволяющая значительно повысить выход продукта [5–7]. Применение ростовых сред и добавок определенного химического состава (без использования белков животного происхождения) дает возможность регулировать целевой профиль продукта, включая состав гликанов, биологическую активность и др.

Оптимизация условий культивирования клеток-продуцентов по различным параметрам (продолжительность, температурный режим, подача газов, контроль pH и др.) имеет ключевое значение [8, 9]. Коэкспрессия дополнительных белков/ферментов может способствовать улучшению выхода целевого продукта [10, 11].

Авторами данной статьи рассматривается реализация подхода, направленного на создание высокопроизводительных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных терапевтических белков на примере деносумаба, разрабатываемого в АО «ГЕНЕРИУМ».

Деносумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело класса IgG2, специфичное к цитокину RANKL — фактору дифференцировки и активации остеокластов. Ингибирование RANKL подавляет процессы созревания и выживаемости остеокластов, тем самым снижая интенсивность резорбции кости [12]. В настоящее время доступны коммерческие препараты на основе деносумаба, одобренные для лечения постменопаузного остеопороза [13, 14] и лечения опухолевых заболеваний (миелома, метастазы в кости, нерезектабельная гигантоклеточная опухоль кости, доброкачественные опухоли кости) [15, 16]. Проводятся доклинические и клинические исследования с применением биоаналогов оригинального препарата деносумаба¹. Получение российского биоаналога деносумаба повысит доступность препарата для пациентов в Российской Федерации, что будет в целом способствовать реализации государственной политики в сфере развития фармацевтической промышленности.

Цель работы — получение высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантного белка деносумаба на основе суспензионной клеточной линии CHO.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Линия клеток CHO-K1 (H-188) получена из коллекции клеточных культур НИЦ «Курчатовский

¹ <https://dhpp.hpfb-dgpsa.ca/review-documents/resource/RDS1710769045419>
<https://dhpp.hpfb-dgpsa.ca/review-documents/resource/RDS1710165579186>
<https://adisinsight.springer.com/drugs/800049295>

институт», ГосНИИгенетика, Россия (далее — линия CHO) и адаптирована к суспензионному культивированию без использования сыворотки и любых других компонентов животного происхождения. В работе использовали следующие реактивы: среда для культивирования BalanCD CHO Growth A (BCD) (Fujifilm, Irvine Scientific, США); подпитка BalanCD CHO Feed 4 (Fujifilm, Irvine Scientific, США); полутвердая среда для клонирования ClonaCell Flex (Stemcell, Канада); буфер для электропорации (MaxCyte, США); фосфатно-солевой буфер, PBS («ЭкоСервис», Россия); Твин 20 (Panreac AppliChem, Испания); контрольный (референтный) препарат деносумаба (Пролиа, Амджен Европа Б.В., Нидерланды); альбумин (Sigma-Aldrich, Япония); козы поликлональные антитела против IgG человека (Sigma, Япония); козы поликлональные антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, Япония); 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Transgen Biotech, Китай); диметилсульфоксид (Sterile Filtered, Cell Culture Tested, CDH, Индия).

Методы

Получение экспрессионных векторов. Синтетические кодон-оптимизированные последовательности генов легкой и тяжелой цепей деносумаба клонировали в экспрессионный вектор с селективным маркером. Полученные плазмиды с генами легкой цепи (pGMR-FAB) и тяжелой цепи (pGMR-FC) в дальнейшем использовали для проведения трансфекции. Экспрессия генов находилась под контролем гибридного CMV α /EF1 α -промотора. Схема вектора аналогична ранее описанной авторами [11].

Суспензионное культивирование клеток CHO. Посевная концентрация жизнеспособных клеток CHO составляла $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки культивировали в среде BalanCD CHO Growth A при 37 °C и 5% CO₂ с поддержанием постоянной влажности не менее 75% и скоростью перемешивания 100 об/мин с помощью шейкера-инкубатора (Infors HT, Multitron, США).

Определение ростовых и продукционных характеристик культуры клеток-продуцентов. Показатель VCD определяли с использованием 0,1% раствора трипанового синего на автоматическом счетчике клеток Countess II FL (Life Technologies, США). Показатели кумулятивной клеточной плотности (cumulative cell density, CCD) и продуктивности вычисляли по формулам, представленным в работах авторов [17, 18].

Трансфекция клеток CHO методом электропорации. Трансфекцию проводили с помощью оборудования для электропорации и кюветы OC-100 (MaxCyte, США) с использованием

протокола CHO. Клетки осаждали центрифугированием, после чего осадок ресуспендировали в буфере для электропорации. Далее суспензию клеток смешивали с плазмидной ДНК легкой и тяжелой цепей (pGMR-FAB и pGMR-FC) в эквимольном соотношении. В случае отрицательного контроля проводили электропорацию в тех же условиях без добавления плазмидной ДНК.

Получение минипулов. Трансфицированные клетки CHO высевали в плоскодонные 96-луночные планшеты (Greiner Bio-One, Австрия) по 50 мкл в ростовой среде BCD с селективными антибиотиками и культивировали при 37 °C, 5% CO₂ и 70% влажности. Затем проводили анализ культуральной жидкости (КЖ) из лунок с минипулами, прошедшими селекцию, методом иммуноферментного анализа (ИФА). Минипулы с наиболее высокой продуктивностью переносили в 24- и 6-луночные планшеты (Greiner Bio-One, Австрия), а затем — в колбы Эрленмейера (Corning, США) с последующей адаптацией к росту в суспензии при постоянном перемешивании.

Получение клонов в полутвердой среде. Клетки лидерного минипула-продуцента высевали в 6-луночные планшеты (Greiner Bio-One, Австрия) в полутвердой среде ClonaCell Flex и инкубировали в стационарных условиях при 37 °C, 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) до момента появления колоний. Отбор клонов проводили с помощью роботизированной системы ClonePix FL (Molecular Devices, США).

Периодическое культивирование. Культивирование продуцентов проводили в среде BCD в минибиореакторах TubeSpin Bioreactor (TPP Techno Plastic Products AG, Швейцария) с посевной концентрацией клеток $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. В качестве подпитки использовали BalanCD CHO Feed 4. Условия культивирования: содержание CO₂ — 5%, влажность — не менее 70%, температурный режим — 37 °C, скорость перемешивания — 100 об/мин. Отбор проб КЖ и подсчет показателей VCD и оценку жизнеспособности проводили каждый день начиная с 3–4 сут культивирования.

Иммуноферментный анализ. Сорбцию проводили в планшетах MaxiSorb (Nunc, Дания) с использованием козых поликлональных антител против IgG человека в концентрации 4 мкг/мл (карбонатно-бикарбонатный буфер, pH 9,4) при 37 °C в течение 1 ч. Далее лунки промывали PBS с добавлением Твин 20 (PBS-T) и проводили блокировку раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS-T (PBS-Ta, Sigma-Aldrich, Япония). Исследуемые образцы, содержащие деносумаб, и контрольный образец (деносумаб,

Пролиа) инкубировали 1 ч при 37 °C на орбитальном термостатируемом шейкере ELMi ST-3L (Elmi, Латвия) при скорости 300 об/мин. После промывания лунок PBS-T добавляли детектирующие козы поликлональные антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, в концентрации 1 мкг/мл в PBS-Та и инкубировали 1 ч при 37 °C на шейкере ELMi ST-3L при 300 об/мин. Далее лунки промывали PBS-T и добавляли раствор тетраметилбензидина (50 мкл). Для остановки реакции использовали раствор серной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (OD_{450}) с помощью спектрофотометра Benchmark Plus (Bio-Rad, Германия).

Криоконсервация клеточных культур. Для криоконсервации культур клеток (в логарифмической фазе роста) использовали ростовую среду без антибиотика, содержащую 10% диметилсульфоксида. Концентрация клеток в ампуле составляла 5–10 млн клеток/мл. После медленного охлаждения ампул с клетками в морозильнике при температуре минус 80 °C в контейнерах для замораживания (Mr. Frosty, Thermo Scientific) ампулы помещали в пары жидкого азота.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На *рисунке 1* представлена схема получения промышленного клона-продуцента терапевтического рекомбинантного белка (на примере деносуаба) на основе клеточной линии CHO, в которой выделяют следующие этапы:

- трансфекция клеток CHO;
- получение минипулов-продуцентов (селекция продуцентов, скрининг для выявления наиболее продуктивных линий, отбор лидерных минипулов);
- получение клонов-продуцентов (процесс клонирования, скрининг полученных клонов, отбор лидерных клонов-продуцентов);
- изучение стабильности роста клонов и уровня экспрессии рекомбинантных белков у лидерных клонов-продуцентов;
- оптимизация процесса культивирования стабильного лидерного клона-продуцента;
- передача клона-продуцента на производство и дальнейшее масштабирование процесса.

Подбор концентрации селективного агента для клеточных линий-продуцентов

Процесс подбора концентрации антибиотиков генетицина и гигромицина для селекции клеток CHO представлен на *рисунке S1* (опубликован на сайте журнала²). Показано, что оптимальными концентрациями антибиотиков для проведения

селекции клеток-продуцентов деносуаба являются 600 мг/л гигромицина и 600 мг/л генетицина. При этих концентрациях жизнеспособность клеток снижалась до нулевых значений на 7 сут культивирования.

Получение минипулов-продуцентов рекомбинантного белка деносуаба на основе клеток линии CHO

Трансфекция клеток линии CHO. После проведения трансфекции клеток CHO определяли показатель VCD и жизнеспособность трансфицированных клеток (*табл. 1*) через 24 и 48 ч для контроля выживаемости клеток. Через 48 ч после трансфекции клетки восстановили свою жизнеспособность, достигнув уровня около 90%.

Получение минипулов-продуцентов. Трансфицированный пул клеток рассевали на минипулы в среде с селективным агентом в 96-луночные планшеты (всего 20 планшетов). Инкубирование проводили в стационарных условиях в CO₂-инкубаторе до достижения 70–90% конфлюэнтного монослоя в ростовой среде BCD с селективными антибиотиками (600 мг/л гигромицина и 600 мг/л генетицина), оптимальная концентрация которых была подобрана заранее (*рис. S1*). Из 1920 минипулов селекцию прошел 1041 минипул, что составило примерно 54% от общей выборки.

Скрининг и отбор лидерных минипулов-продуцентов. На 10 сут инкубирования проводили скрининг проб КЖ минипулов-продуцентов из 96-луночных планшетов с использованием метода ИФА (*рис. 2A*). Максимальная продуктивность минипулов достигла 200 мг/л. Далее 240 минипулов с максимальной продуктивностью (лидерные минипулы) перенесли в 24-луночные планшеты. Скрининг проб КЖ минипулов из 24-луночных планшетов (*рис. 2B*) показал, что максимальная продуктивность составила 90 мг/л. Затем 88 лидерных минипулов переносили в 6-луночные планшеты и культивировали в стационарных условиях. Анализ продуктивности минипулов из 6-луночных планшетов (*рис. 2C*) позволил выявить 23 лидерных минипула, которые были переведены в условия культивирования с перемешиванием в мини-биореакторах для адаптации роста и восстановления жизнеспособности клеток.

Таким образом, из 1041 минипула, прошедшего селекцию, после нескольких этапов скрининга было отобрано 23 минипула с лучшими показателями продуктивности деносуаба. Данные минипулы переносили в условия шейкерного культивирования для проведения адаптации и последующей криоконсервации культур клеток.

² <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-553-fig-s1>

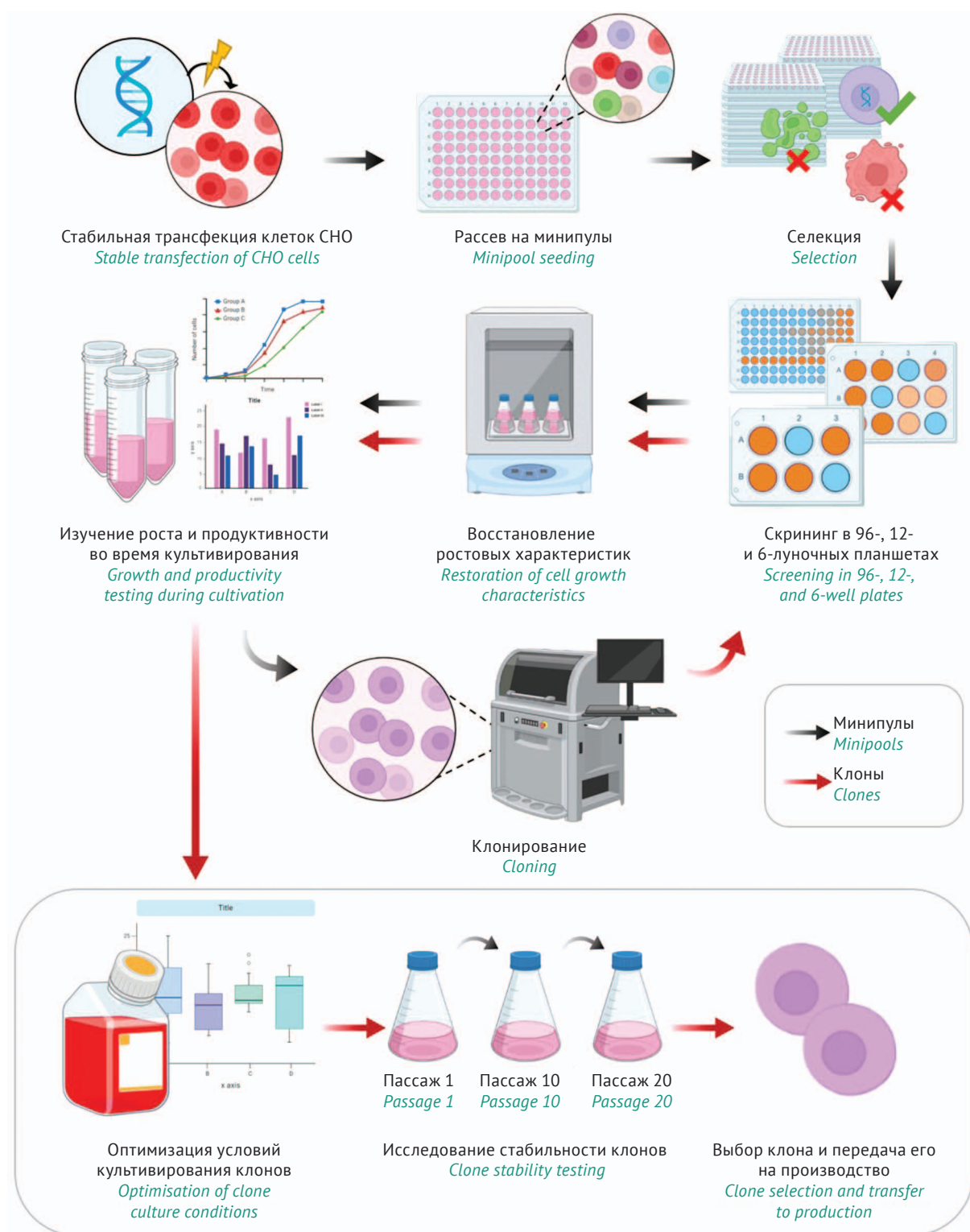


Рисунок подготовлен авторами с использованием шаблонов biorender.com / This figure is prepared by the authors using the templates from biorender.com

Рис. 1. Схема получения клеточных линий-продуцентов рекомбинантного белка (на примере деносумаба) на основе клеточной линии CHO.

Fig. 1. Schematic representation of obtaining CHO-based cell lines producing recombinant proteins (based on the example of denosumab).

Таблица 1. Жизнеспособность и концентрация жизнеспособных клеток CHO после трансфекции
Table 1. Viability and viable cell density of CHO cells after transfection

Плазмиды <i>Plasmids</i>	Время после трансфекции, ч <i>Time after transfection, h</i>			
	24		48	
	VCD, $\times 10^6$ клеток/мл <i>VCD, $\times 10^6$ cells/mL</i>	Жизнеспособность, % <i>Viability, %</i>	VCD, $\times 10^6$ клеток/мл <i>VCD, $\times 10^6$ cells/mL</i>	Жизнеспособность, % <i>Viability, %</i>
pGMR-FC + pGMR-FAB	1,1	68	1,83	89
Контроль <i>Control</i>	1,2	95	1,55	92

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

Примечание. VCD – концентрация жизнеспособных клеток.
Note. VCD, viable cell density.

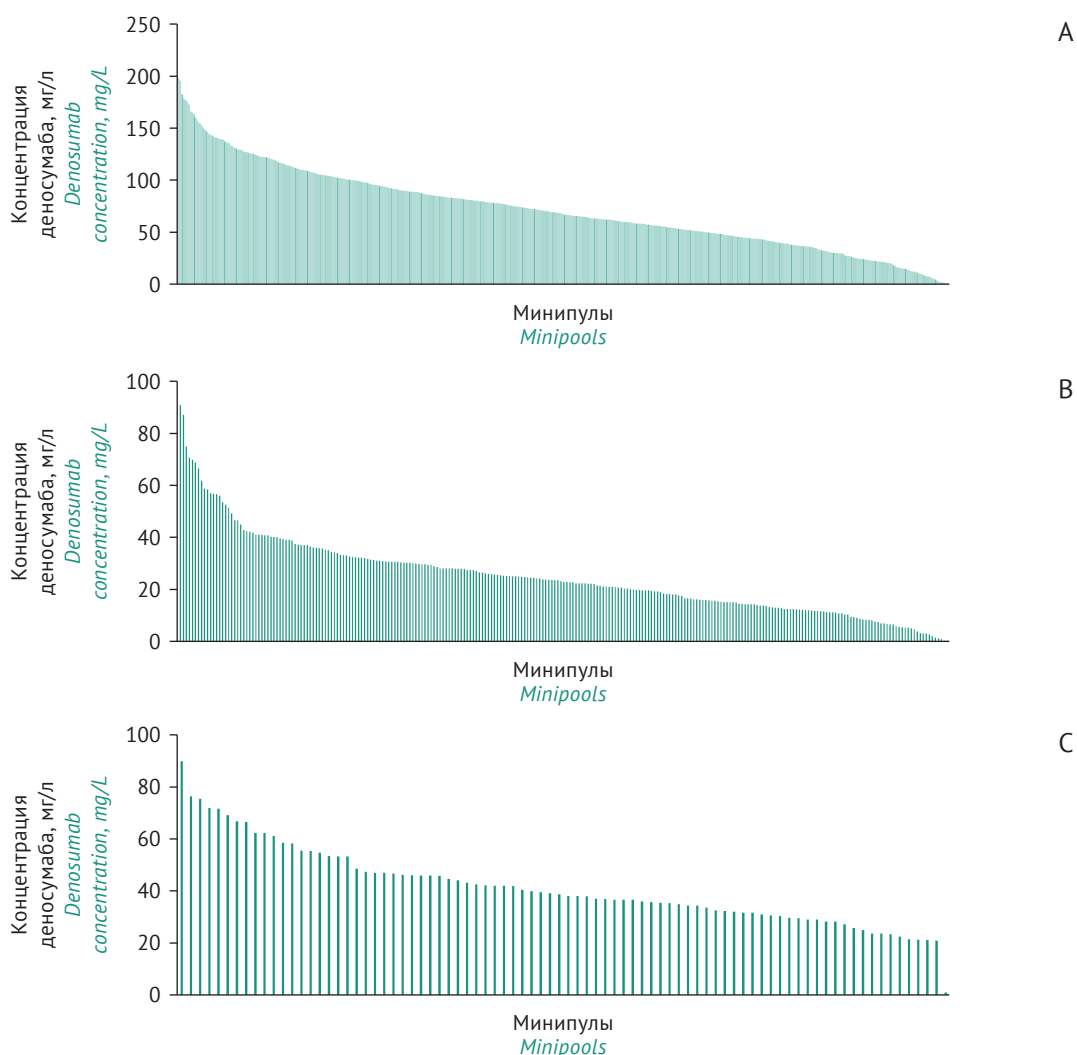


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Распределение минипулов-продуцентов по концентрации целевого белка (деносумаб) в культуральной жидкости при культивировании в планшетах: А – 96-луночные планшеты (1041 минипул); В – 24-луночные планшеты (240 минипулов); С – 6-луночные планшеты (88 минипулов).

Fig. 2. Distribution of producer minipools according to the content of the target protein (denosumab) in culture fluid during plate culture: A, 96-well plates (1041 minipools); B, 24-well plates (240 minipools); C, 6-well plates (88 minipools).

Исследование ростовых и продукционных характеристик минипулов. Для определения наиболее перспективных кандидатов проводили периодическое культивирование минипулов-продуцентов деносумаба в течение 7 сут (рис. 3). Для всех минипулов отмечали высокую жизнеспособность, превышающую 90% (рис. 3А). Максимальное значение показателя VCD (более 30×10^6 клеток/мл) наблюдали на 7 сут для следующих минипулов: mp-14 ($36,3 \times 10^6$ клеток/мл), mp-16 ($34,5 \times 10^6$ клеток/мл), mp-20 ($33,8 \times 10^6$ клеток/мл) (рис. 3В). Показатель волюметрической продуктивности (VCD) варьировал от 0,6 до 1,9 г/л среди всей выборки продуцентов (рис. 3С). Выявлены минипулы-продуценты с наибольшим выходом целевого белка (более 1,7 г/л) на 7 сут: mp-19 (1,92 г/л), mp-14 (1,82 г/л), mp-4 (1,75 г/л).

Таким образом, определены минипулы, для которых продемонстрирован высокий показатель клеточной плотности одновременно с максимальным выходом целевого продукта деносумаба: mp-14, mp-4, mp-19 (рис. 3Д). После сравнительного исследования физико-химических свойств полученного белка и контрольного препарата, включая изучение профиля гликозилирования (результаты не приведены),

для дальнейшего клонирования был выбран минипул-продуцент mp-19.

Получение моноклональных клонов-продуцентов рекомбинантного белка деносумаба

Клоны-продуценты рекомбинантного белка деносумаба получали методом клонирования в полутвердую среду с последующим отбором клонов с помощью роботизированной системы ClonePix FL (в 12- и 96-лучных планшетах, всего 1056 колоний). Для определения лидерных клонов проводили серию скринингов КЖ клонов-продуцентов деносумаба методом ИФА. В ходе скрининга отбирали клоны с максимальной продуктивностью (результаты не приведены), в соответствии с принципом, представленным на рисунке 1. Выбранные лидерные клоны-продуценты (24 клон) переносили в условия шейкерного культивирования для проведения адаптации и последующей криоконсервации культур клеток.

Оптимизация культивирования клонов-продуцентов деносумаба

Культивирование клонов-продуцентов деносумаба в непрерывном режиме с подпиткой проводили в течение 9 сут, исследуя ростовые и продукционные характеристики культур

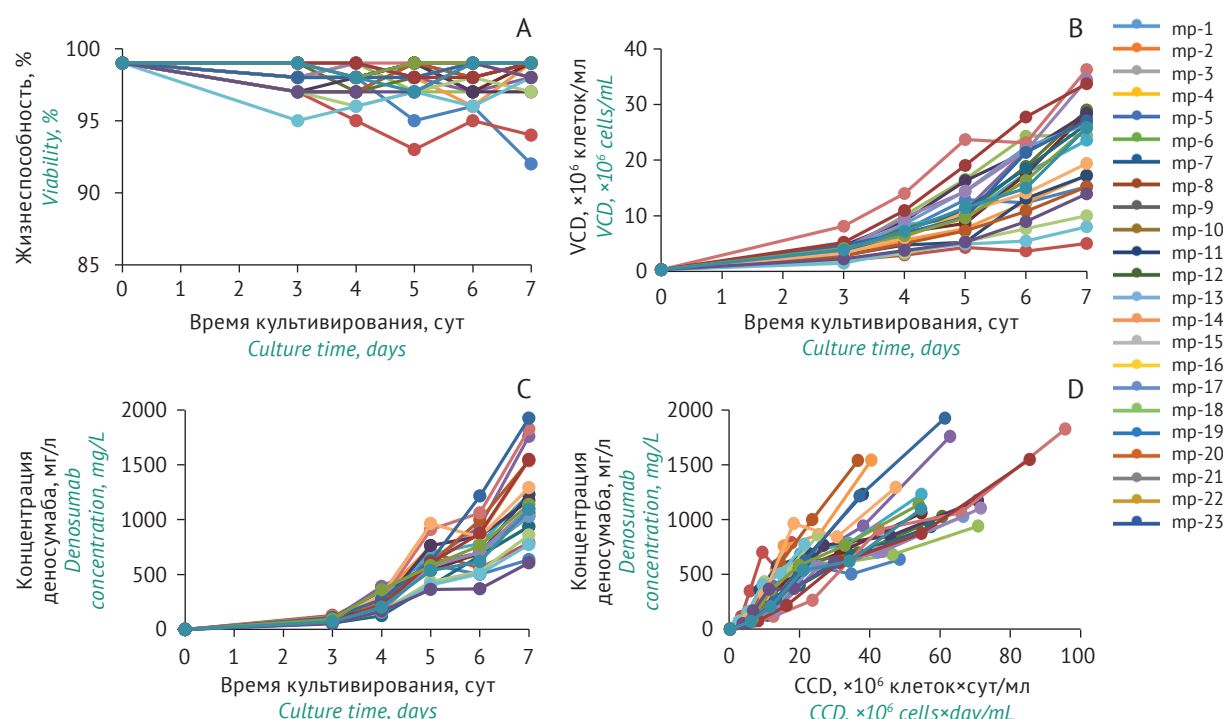


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Характеристика минипулов-продуцентов деносумаба во время культивирования в течение 7 сут: А — жизнеспособность клеток; В — концентрация жизнеспособных клеток (VCD); С — продуктивность клеток; Д — зависимость кумулятивной клеточной плотности (CCD) от продуктивности. mp — минипулы-продуценты деносумаба.

Fig. 3. Characteristics of denosumab-producing minipools during 7 days of culture: A, cell viability; B, viable cell density (VCD); C, cell productivity; D, cumulative cell density (CCD) vs cell productivity; mp, minipools of denosumab-producing cell lines.

(рис. S2, опубликован на сайте журнала³). Жизнеспособность клонов к 9 сут оставалась более 80% (рис. S2A). Максимальное значение показателя VCD (более 45×10^6 клеток/мл) фиксировали на 6–8 сут культивирования для следующих клонов-продуцентов: clone-12 ($48,5 \times 10^6$ клеток/мл) и clone-23 ($47,7 \times 10^6$ клеток/мл) (рис. S2B). Продуктивность клонов варьировала от 0,9 до 6,5 г/л (рис. S2C). Выделены лидерные клоны с продуктивностью деносуаба более 6 г/л: clone-8 (6,58 г/л), clone-13 (6,52 г/л), clone-19 (6,04 г/л). Определены клоны, для которых продемонстрированы одновременно высокие значения плотности жизнеспособных клеток и выхода продукта: clone-13, clone-8, clone-11, clone-6 (рис. S2D). Максимальная специфическая продуктивность (выше 35 пг/клетка/сут) показана для следующих клонов: clone-16 (38,5 пг/клетка/сут), clone-5 (36,2 пг/клетка/сут), clone-19 (35,9 пг/клетка/сут) (табл. 2).

Таким образом, в результате проведенного исследования была получена панель клонов-продуцентов рекомбинантного терапевтического белка деносуаба. Лидерные клоны (6–8 клонов), характеризующиеся оптимальными параметрами, были отобраны для последующих экспериментов, направленных на оценку стабильности ростовых и продукционных свойств.

ОБСУЖДЕНИЕ

Критическим аспектом разработки рекомбинантных терапевтических белков является выбор клеточной линии-продуцента. Для производства рекомбинантных белков в биофармацевтическом производстве наиболее часто используют линию клеток яичника китайского хомячка СНО [19]. Имеющийся опыт создания препаратов на основе этой клеточной линии может существенно сократить сроки и затраты при разработке лекарственных средств [20]. Клетки СНО пригодны для крупномасштабных промышленных процессов культивирования в суспензионных условиях благодаря способности достигать высоких показателей VCD и обеспечивать максимальный выход белка [21–23]. Важным преимуществом является профиль гликозилирования продуцируемых белков, близкий человеческому, что повышает вероятность сохранения биологической активности рекомбинантных белков в организме человека и обеспечивает эффективность терапии [24]. Культура клеток СНО характеризуется низкой восприимчивостью к вирусам человека, обусловленной

Таблица 2. Специфическая продуктивность клонов-продуцентов деносуаба

Table 2. Specific productivity of clones producing denosumab

Клон Clone	Специфическая продуктивность, пг/клетка/сут Specific productivity, pg/cell/day				
	Время культивирования, сут Culture time, days				
	5	6	7	8	9
clone-1	11,6	14,4	5,4	23,0	16,9
clone-2	14,7	28,4	13,1	29,5	26,4
clone-3	2,8	8,8	9,8	10,2	17,6
clone-4	8,7	22,1	20,2	22,5	15,8
clone-5	11,3	27,5	14,6	26,1	36,2
clone-6	9,7	14,5	18,2	21,1	24,9
clone-7	10,6	18,3	14,6	17,7	22,6
clone-8	14,3	18,9	8,1	24,0	32,2
clone-9	8,5	16,1	9,1	22,6	19,7
clone-10	14,3	20,5	36,9	22,1	13,1
clone-11	9,1	16,8	6,6	13,5	28,4
clone-12	6,0	15,1	15,6	14,4	11,1
clone-13	12,6	23,0	14,0	20,7	32,5
clone-14	4,9	15,2	24,8	16,3	25,0
clone-15	10,7	19,2	20,4	21,9	31,9
clone-16	8,4	18,6	19,6	22,0	38,5
clone-17	0,0	5,2	13,7	13,7	11,2
clone-18	8,0	14,1	14,9	17,6	27,2
clone-19	8,9	18,4	16,5	21,5	35,9
clone-20	0,1	6,8	20,1	10,3	5,0
clone-21	5,6	13,4	16,1	12,0	20,3
clone-22	0,0	9,1	28,9	11,2	18,6
clone-23	3,2	9,2	17,5	9,5	19,2
clone-24	2,0	5,5	28,1	15,1	20,6

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

Примечание. Clone — моноклональные клеточные линии-продуценты деносуаба.

Note. Clone, monoclonal cell lines producing denosumab.

отсутствием экспрессии многих человеческих вирусных генов, что делает эту клеточную линию предпочтительной с точки зрения биобезопасности при коммерческом производстве препаратов [25–27]. Способность клеток линии СНО адаптироваться к изменениям pH, уровня кислорода, давлению или температуре [28]

³ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-553-fig-s2>

позволяет варьировать критические параметры качества конечного продукта. Клетки CHO способны к росту в бессывороточных средах, что снижает риск контаминации вирусами и прионами, обеспечивая биобезопасность терапевтических белков. Применение таких сред также способствует воспроизводимости профиля качества белка, повышению продуктивности клеточной линии и оптимизации стадий выделения и очистки белка (за счет снижения белковых примесей) [29].

К недостаткам линии CHO относится присутствие в гликозилированных рекомбинантных белках гликанов (галактоза-альфа-1,3-галактоза, N-гликолилнейраминаовая кислота) [30, 31], что может повышать иммуногенность и изменять фармакокинетику терапевтического белка [32].

Основные этапы процесса разработки стабильных моноклональных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков (cell line development) могут варьировать в зависимости от используемых модифицированных клеточных линий, экспрессионных векторов, методов и оборудования.

Экспрессионный вектор должен содержать все необходимые регуляторные элементы для обеспечения эффективной экспрессии целевого гена, встроенного в геном родительской клеточной линии. Вектор подбирается под определенный тип клеток и целевой белок. От должного конструирования генно-инженерной конструкции и содержания регуляторных элементов зависит продукция целевого белка. В настоящее время изучены и апробированы различные регуляторные генетические элементы, которые способствуют увеличению выхода целевого белка [33].

Тип селективного маркера является ключевым фактором при получении продуцентов. Для селекции продуцентов традиционно применяются векторы, содержащие гены устойчивости к антибиотикам, такие как ген пурамицин-N-ацетилтрансферазы, позволяющий трансфицированным клеткам расти в присутствии антибиотика. Для эффективного проведения селекции и отбора высокопродуктивных клеточных линий на предварительном этапе работ подбирается оптимальная концентрация селективного антибиотика. Выбор системы селекции определяется конкретной клеточной линией; например, существуют линии, система селекции которых основана на механизмах ауксотрофии, такие как CHO-DG44 [34], CHO-GS и др. В последнее время активно внедряют методы получения новых клеточных линий и улучшения клеточного метаболизма существующих линий с помощью CRISPR/Cas9 [35].

Для трансфекции эукариотических клеточных линий применяются различные реагенты (липофектамин, полиэтиленимин), а также электропораторы и др. Наиболее распространенным методом для стабильной трансфекции эукариотических клеток является электропорация [36]. Параметры электропорации (напряжение, длительность импульса, частота и др.) подбираются индивидуально для каждой клеточной линии, обеспечивая максимальную эффективность трансфекции и стабильную интеграцию генно-инженерной конструкции в геном клеток хозяина.

Использование моноклональной клеточной линии для производства рекомбинантных терапевтических белков является обязательным регуляторным требованием для регистрации лекарственных препаратов. Моноклональность культуры играет ключевую роль в обеспечении качества биотехнологического продукта, полученного с помощью технологии рекомбинантной ДНК, и стабильности производственного процесса [37]. При разработке моноклональных клеточных линий используют различные подходы, в том числе метод предельного разведения, а также специализированное оборудование, предназначенное для обеспечения получения клеточной линии из одной клетки-предшественницы с высокой вероятностью (дозаторы единичных клеток, сортеры, роботизированные системы для получения клонов, системы фотодокументирования планшетов и др.). В данной работе для получения клонов-продуцентов деносумаба была использована роботизированная система Clone Pix, осуществляющая отбор колоний клеток из полутвердой среды в автоматическом режиме при асептических условиях [38].

Для получения высокопродуктивного продуцента необходима большая выборка клеточных линий. В данной работе из 1920 минипулов селекцию прошел 1041 минипул (около 54%). Среди них при культивировании в периодическом режиме в течение 7 сут было выявлено 4 минипула с продуктивностью более 1,5 г/л (0,2%). Затем лидерный минипул с продуктивностью около 2 г/л был клонирован, в результате чего получено 1056 моноклонов. При культивировании среди них было выявлено 3 моноклона с продуктивностью более 6 г/л (0,3%). Таким образом, на основе имеющейся выборки минипулов и клонов удалось выявить моноклоны, обеспечивающие титр целевого белка на 9 сут более 6 г/л. Этот подход позволяет прогнозировать необходимое количество исследуемых клеточных линий для достижения требуемого уровня выхода целевого белка. В настоящее время

активно применяется математическое моделирование при отборе наиболее предпочтительных клонов по разным показателям [39].

Подход к разработке моноклональных клеточных линий-продуцентов может значительно различаться в зависимости от выбора родительской клеточной линии, экспрессионных векторов, используемых материалов, методов анализа и оборудования на разных этапах разработки. Достижение высоких титров целевого рекомбинантного белка стало возможным благодаря комплексу работ, направленных на усовершенствование векторов экспрессии; выбора клеток-хозяев, методов скрининга, продуцентов, высокотехнологичного оборудования; оптимизацию сред и подпиток определенного химического состава, а также благодаря применению инновационных решений в этой области.

Рост спроса на биотерапевтические препараты стимулирует необходимость сокращения времени и затрат на разработку клеточных линий. Это способствует совершенствованию методов, реактивов и оборудования для получения клонов-продуцентов.

Авторы данной работы представили собственный подход и описали основные этапы процесса разработки стабильных моноклональных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков на основе суспензионной клеточной линии CHO на примере получения продуцентов деносумаба.

ВЫВОДЫ

1. Отработана схема получения высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков на основе суспензионной клеточной линии CHO.
2. Получены высокопродуктивные моноклональные клеточные линии-продуценты рекомбинантного терапевтического белка деносумаба с выходом целевого белка более 6 г/л.
3. Предложенный подход к созданию клеточных линий-продуцентов может быть использован для получения широкого спектра коммерчески значимых рекомбинантных белков, включая моноклональные антитела, ферменты, факторы свертывания крови и другие белки.

Литература/References

1. Zhu MM, Mollet M, Hubert RS, Kyung YS, Zhang GG. Industrial production of therapeutic proteins: Cell lines, cell culture, and purification. *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. 2017;(3):1639–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52287-6_29
2. Yang Y, Li Z, Li Q, Ma K, Lin Y, Feng H, Wang T. Increase recombinant antibody yields through optimizing vector design and production process in CHO cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022;106(13–16):4963–75. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12051-5>
3. Fischer S, Handrick R, Otte K. The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnol Adv*. 2015;33(8):1878–96. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.015>
4. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv*. 2012;30(5):1158–70. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022>
5. Thombre S, Gadgil M. Increase in efficiency of media utilization for recombinant protein production in Chinese hamster ovary culture through dilution. *Biotechnol Appl Biochem*. 2011;58(1):25–31. <https://doi.org/10.1002/bab.9>
6. Pal D, Patel G, Dobariya P, Nile SH, Pande AH, Banerjee UC. Optimization of medium composition to increase the expression of recombinant human interferon- β using the Plackett–Burman and central composite design in *E. coli* SE1. *3 Biotech*. 2021;11(5):226. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02772-1>
7. Li W, Fan Z, Lin Y, Wang T-Y. Serum-free medium for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary cells front. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:646363. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.646363>
8. Almo SC, Love JD. Better and faster: Improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr Opin Struct Biol*. 2014;26:39–43. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.03.006>
9. Schellenberg J, Nagraik T, Wohlenberg OJ, Ruhl S, Bahne-mann J, Scheper T, Solle D. Stress-induced increase of monoclonal antibody production in CHO cells. *Eng Life Sci*. 2022;22(5):427–36. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100062>
10. Zhu X, Zhang K, Luo H, Wu J. Overexpression of the class A penicillin-binding protein PonA in *Bacillus* improves recombinant protein production. *Bioresour Technol*. 2023;383:129219. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129219>
11. Тимонова СС, Смолова КА, Зарипова ДТ, Пантюшенко МС, Королева МА, Анисимов РЛ и др. Увеличение продуктивности клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилглицин-генерирующего фермента. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(1):80–93. Timonova SS, Smolova KA, Zaripova DT, Pantyushenko MS, Koroleva MA, Anisimov RL, et al. Increasing productivity of arylsulfatase B-producing cell line by coexpression of formylglycine-generating enzyme. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(1):80–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-1-80-93>
12. Lu J, Hu D, Zhang Y, Ma C, Shen L, Shuai B. Current comprehensive understanding of denosumab (the RANKL neutralizing antibody) in the treatment of bone metastasis of malignant tumors, including pharmacological mechanism and clinical trials. *Front Oncol*. 2023;13:1133828. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1133828>
13. Di Lorenzo L. Denosumab in elderly osteoporotic patients. A narrative review. *Clin Ter*. 2023;174(6):545–9. <https://doi.org/10.7417/CT.2023.5023>
14. Abduekkareem AR, Guella A, Hamrouni AM, Hassanein MM, Nasr A, Rana O. Denosumab use in chronic kidney disease associated osteoporosis: A narrative review. *Risk Manag Healthc Policy*. 2023;16:1809–13. <https://doi.org/10.2147/RMHP.S426869>
15. Tan X, Zhang Y, Wei D, Yang Y, Xiang F. Denosumab for giant cell tumors of bone from 2010 to 2022: A bibliometric

- analysis. *Clin Exp Med*. 2023;23(7):3053–75. <https://doi.org/10.1007/s10238-023-01079-0>
16. Imre A, Zoltán S, Miklós S. Current indications for denosumab in benign bone tumours. *EFORT Open Rev*. 2023;8(12):895–905. <https://doi.org/10.1530/EOR-23-0138>
 17. Тимонова СС, Пантюшенко МС, Тихонов РВ, Пискунов АА, Бадэ ВН. Оптимизация процесса культивирования клона-продуцента рекомбинантного лизосомально-го фермента идуронат-2-сульфатазы. *Биотехнология*. 2021;37(2):34–47. Timonova SS, Pantyushenko MS, Tikhonov RV, Piskunov AA, Bade VN. Optimization of the cultivation process of a producer clone of the recombinant lysosomal iduronate-2-sulfatase enzyme. *Biotechnology*. 2021;37(2):34–47 (In Russ.). <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-2-34-47>
 18. Тимонова СС, Павелко ВИ, Кирик ИА, Бадэ ВН, Малыгина ТО, Хамитов РА, Пискунов АА. Принцип оперативного выбора лидерных клонов-продуцентов моноклональных антител при создании стабильных клеточных линий на основе CHO. *Биотехнология*. 2019;35(4):65–72. Timonova SS, Pavelko VI, Kirik IA, Bade VN, Malygina TO, Khamitov RA, Piskunov AA. Principle of express selection of leading producing clones of monoclonal antibodies in the development of stable CHO-based cell lines. *Biotechnology*. 2019;35(4):65–72 (In Russ.). <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-4-65-72>
 19. Tihanyi B, Nyitray L. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discov Today Technol*. 2020;38:25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>
 20. Lewis NE, Liu X, Li Y, Nagarajan H, Yerganian G, O'Brien E. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nat Biotechnol*. 2013;31(8):759–65. <https://doi.org/10.1038/nbt.2624>
 21. Huang YM, Hu W, Rustandi E, Chang K, Yusuf-Makagiansar H, Ryll T. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol Prog*. 2010;26(5):1400–10. <https://doi.org/10.1002/btpr.436>
 22. Lai T, Yang Y, Ng SK. Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(5):579–603. <https://doi.org/10.3390/ph6050579>
 23. Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(3):917–30. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>
 24. El Maï N, Donadio-Andréi S, Iss C, Calabro V, Ronin C. Engineering a human-like glycosylation to produce therapeutic glycoproteins based on 6-linked sialylation in CHO cells. *Methods Mol Biol*. 2013;988:19–29. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-327-5_2
 25. Boeger H, Bushnell DA, Davis R, Griesenbeck J, Lorch Y, Strattan JS, et al. Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Lett*. 2005;579(4):899–903. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.027>
 26. Bandaranayake A.D, Almo SC. Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett*. 2014;588(2):253–260. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.035>
 27. Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z, Liu X, et al. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol*. 2011;29(8):735–41. <https://doi.org/10.1038/nbt.1932>
 28. Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs*. 2010;2(5):466–79. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12720>
 29. Dumont J, Euwart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: History, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36(6):1110–22. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>
 30. Liu L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *J Pharm Sci*. 2015;104(6):1866–84. <https://doi.org/10.1002/jps.24444>
 31. Sommer JM, Buyue Y, Bardan S, Peters RT, Jiang H, Kamphaus GD, et al. Comparative field study: impact of laboratory assay variability on the assessment of recombinant factor IX Fc fusion protein (rFIXFc) activity. *Thromb Haemost*. 2014;112(5):932–40. <https://doi.org/10.1160/TH13-11-0971>
 32. Butler M, Spearman M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2014;30:107–12. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.010>
 33. Maksimenko O, Gasanov NB, Georgiev P. Regulatory elements in vectors for efficient generation of cell lines producing target proteins. *Acta Naturae*. 2015;7(3):15–26. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-3-15-26>
 34. Csató-Kovács E, Salamon P, Fikó-László S, Kovács K, Koka A, András-Korodi M, et al. Development of a mammalian cell line for stable production of anti-PD-1. *Antibodies (Basel)*. 2024;13(4):82. <https://doi.org/10.3390/antib13040082>
 35. Grav LM, Rojek JB, la Cour Karottki KJ, Lee JS, Kildegaard HF. Application of CRISPR/Cas9 genome editing to improve recombinant protein production in CHO cells. *Methods Mol Biol*. 2025;2853:49–69. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4104-0_5
 36. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ*. 2021;9:e11165. <https://doi.org/10.7717/peerj.11165>
 37. Welch JT, Arden NS. Considering “clonality”: A regulatory perspective on the importance of the clonal derivation of mammalian cell banks in biopharmaceutical development. *Biologicals*. 2019;62:16–21. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.09.006>
 38. Тимонова СС, Павелко ВИ, Кирик ИА, Бадэ ВН, Пискунов АА, Хамитов РА. Метод Монте-Карло для вычисления вероятности моноклональности клеточных линий. *Биотехнология*. 2024;40(1):100–8. Timonova SS, Pavelko VI, Kirik IA, Bade VN, Piskunova AA, Khamitov RA. Monte Carlo method for calculating the probability of monoclonality of cell lines. *Biotechnology*. 2024;40(1):100–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.56304/S0234275824010113>
 39. Goldrick S, Alosert H, Lovelady C, Bond NJ, Senussi T, Hatton D, et al. Next-generation cell line selection methodology leveraging data lakes, natural language generation and advanced data analytics. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1160223. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1160223>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены рисунки S1 и S2. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-553-fig-s1> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-553-fig-s2>

Additional information. Figures S1 and S2 are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-553-fig-s1> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-553-fig-s2>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.С. Тимонова** — выполнение экспериментальных работ, получение клеточных линий, обработка и анализ данных, написание текста рукописи, формулировка выводов; **И.А. Кирик** — анализ данных, критическое обсуждение, написание текста рукописи; **М.А. Филатова** — проведение скрининга с использованием ИФА; **А.И. Анфилатова, С.С. Шубина, А.А. Полупанова** — подбор концентрации антибиотиков для линии CHO; **А.Ф. Габдрахманова, Е.С. Иванов** — получение клеточных линий продуцентов; **В.Н. Бадэ** — анализ данных, критическое обсуждение текста рукописи; **А.А. Пискунов** — критическое обсуждение и доработка текста рукописи; **Р.А. Хамитов** — концепция работы, формулировка выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

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

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **S.S. Timonova** conducted experiments, developed cell lines, processed and analysed data, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **I.A. Kirik** analysed data, drafted and critically discussed the manuscript. **M.A. Filatova** conducted ELISA screening. **A.I. Anfilatova, S.S. Shubina,** and **A.A. Polupanova** selected the optimum antibiotic concentration for CHO cells. **A.F. Gabdrakhmanova, E.S. Ivanov** developed cell lines. **V.N. Bade** analysed data and critically discussed the manuscript. **A.A. Piskunov** critically discussed and revised the manuscript. **R.A. Khamitov** conceptualised the study, formulated the conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication.

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

Об авторах / Authors

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

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

Кирик Инесса Анатольевна, канд. биол. наук / Inessa A. Kirik, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0364-8107>

Филатова Мария Александровна, канд. вет. наук / Maria A. Filatova, Cand. Sci. (Vet.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-1542-3905>

Анфилатова Анастасия Ивановна / Anastasia I. Anfilatova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-9518-2942>

Шубина Софья Сергеевна / Sofia S. Shubina

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

Полупанова Анна Андреевна / Anna A. Polupanova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-2975-9111>

Габдрахманова Алина Фаритовна / Alina F. Gabdrakhmanova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6022-0863>

Иванов Евгений Сергеевич / Evgeny S. Ivanov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-0441-4918>

Бадэ Вероника Николаевна, канд. биол. наук / Veronika N. Bade, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9877-5220>

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

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

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

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

Поступила 16.11.2023

После доработки 06.04.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Online first 01.07.2025

Received 16 November 2023

Revised 6 April 2025

Accepted 6 June 2025

Online first 1 July 2025



Промоторы для высокоэффективной экспрессии и секреции проинсулина в *Saccharomyces cerevisiae*

Е.А. Буслаева[✉], З.Р. Хасаншина, И.А. Корнаков, М.П. Коробкина, В.И. Шмурак, Р.В. Драй

Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг», ул. Связи, д. 34, лит. А, пос. Стрельна, Санкт-Петербург, 198515, Российская Федерация

✉ Буслаева Евгения Александровна; Evgeniia.Buslaeva@geropharm.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Нехватка систематических сравнительных данных об активности промоторов в *Saccharomyces cerevisiae* является фактором, ограничивающим повышение эффективности биосинтеза рекомбинантного проинсулина человека. Настоящая работа направлена на экспериментальное сравнение активности ряда конститутивных промоторов в стандартных технологических условиях для определения наиболее продуктивного регуляторного элемента, применимого в промышленных штаммах-продуцентах.

ЦЕЛЬ. Оценить влияние промоторов *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3* (*GPD*), *TPI1* на экспрессию рекомбинантного проинсулина человека в *Saccharomyces cerevisiae* и ранжировать их по силе для выбора оптимального промотора, обеспечивающего максимальную продуктивность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Для экспрессии предшественника инсулина (проинсулина) человека использовали диплоидный штамм *S. cerevisiae* YS3, полученный слиянием гаплоидных клеток. Векторная система на основе плазмиды pRS425 включала в себя синтетические промоторы (*TPI1*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3*) и сигнальную последовательность. Конструкции вводили в клетки методом электропорации. Сравнительный анализ экспрессии белка проводили при культивировании *S. cerevisiae* YS3 в колбах и биореакторах с использованием среды YPD. Определение содержания проинсулина и этанола осуществляли с помощью спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и газовой хроматографии. Подтверждение экспрессии проводили методом ВЭЖХ, совмещенной с масс-спектрометрией. Статистическая обработка данных выполнялась при помощи дисперсионного и корреляционного анализов.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Получены штаммы-продуценты *S. cerevisiae* YS3/pF1145 (*TPI1*), YS3/pF1157 (*TEF1*), YS3/pF1199 (*ADH2*), YS3/pF1200 (*ALD4*), YS3/pF1201 (*TDH3*), и проведено сравнение уровня экспрессии рекомбинантного белка. Штамм YS3/pF1201, в котором экспрессия проинсулина находилась под контролем промотора *TDH3*, обладал максимальной продуктивностью (15,51±0,57 мг/л). В процессе ферментации в лабораторных биореакторах продуктивность штамма YS3/pF1201 (*TDH3*) достигла 139,17 мг/л через 72 ч культивирования при значении биомассы 154,50 г/л.

ВЫВОДЫ. Промоторы для экспрессии проинсулина в клетках *S. cerevisiae* можно распределить по их силе в следующем порядке: *TDH3*~*ALD4*>*ADH2*>*TEF1*>*TPI1*. В процессе ферментации при использовании промотора *TDH3* достигнута продуктивность, превышающая в 6,1 раза продуктивность штамма-продуцента с классическим промотором *TPI1*, который используется для экспрессии проинсулина.

Ключевые слова: проинсулин; дрожжи; *Saccharomyces cerevisiae*; рекомбинантные белки; ферментация; плазмиды; экспрессия; конститутивный промотор; биореакторы

Для цитирования: Буслаева Е.А., Хасаншина З.Р., Корнаков И.А., Коробкина М.П., Шмурак В.И., Драï Р.В. Промоторы для высокоэффективной экспрессии и секреции проинсулина в *Saccharomyces cerevisiae*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):258–270. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-258-270>

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГЕРОФАРМ».
Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Promoters for high-efficiency expression and proinsulin secretion in *Saccharomyces cerevisiae*

Eugenia A. Buslaeva✉, Zukhra R. Khasanshina, Igor A. Kornakov, Mariya P. Korobkina, Vladimir I. Shmurak, Roman V. Draï

Pharmholding CJSC, 34 Svyazi St., Strelna, St Petersburg 198515, Russian Federation

✉ Evgeniia A. Buslaeva; Evgeniia.Buslaeva@geropharm.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. The lack of systematic research comparing promoter activity in *Saccharomyces cerevisiae* limits approaches to improving the efficiency of recombinant human proinsulin biosynthesis. This study compared the activity of constitutive promoters under standardised technological conditions to identify the most productive regulatory elements for application in industrial strains.

AIM. This study aimed to compare the influence of *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3* (*GPD*), and *TPI1* promoters on recombinant proinsulin expression in *Saccharomyces cerevisiae* and rank their effectiveness for selecting a highly productive promoter.

MATERIALS AND METHODS. *S. cerevisiae* YS3 diploid strain obtained by haploid cells fusion was used for proinsulin expression. The vectors based on the pRS425 plasmid consisted of synthetic promoters (*TPI1*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3*) and signal sequence. Plasmids were electroporated in the cell. Comparative expression analysis was performed by cultivating *S. cerevisiae* YS3 in flasks and bioreactors using YPD media. Proinsulin and ethanol concentration was measured using spectrophotometry, HPLC, and gas chromatography. The expression was confirmed using HPLC-MS. Statistical analysis included variance and correlation analysis.

RESULTS. Strains *S. cerevisiae* YS3/pF1145 (*TPI1*), YS3/pF1157 (*TEF1*), YS3/pF1199 (*ADH2*), YS3/pF1200 (*ALD4*), and YS3/pF1201 (*TDH3*) were obtained, then expressions of recombinant protein were compared. The strain YS3/pF1201 that had proinsulin expression controlled by the promoter *TDH3* showed a maximum productivity of 15.51±0.57 mg/L. When fermented in laboratory bioreactors, the strain YS3/pF1201 achieved a productivity of 139.17 mg/L and a biomass of 154.5 mg/L after 72 hours of cultivation.

CONCLUSIONS. Analysis of experimental data ranked the promoters for proinsulin expression in *S. cerevisiae* cells by their effectiveness: *TDH3*~*ALD4*>*ADH2*>*TEF1*>*TPI1*. During the fermentation, *TDH3* promoter showed significantly higher productivity, which was 6.1 times more than in the classical strain with the *TPI1* promoter for proinsulin expression.

Keywords: proinsulin; yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; recombinant proteins; fermentation; plasmids; expression; constitutive promoter; bioreactors

For citation: Buslaeva E.A., Khasanshina Z.R., Kornakov I.A., Korobkina M.P., Shmurak V.I., Draï R.V. Promoters for high-efficiency expression and proinsulin secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):258–270. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-258-270>

Funding. The work was financially supported by GEROPHARM.
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Список сокращений

ADH2 — ген алкогольдегидрогеназы II;
Adr1 — регулятор синтеза алкогольдегидрогеназы II;
ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6 — гены альдегиддегидрогеназ 2–6;
ANOVA — дисперсионный анализ;
DHAP — дигидроксиацетонфосфат;
eEF1 — фактор элонгации трансляции 1;
GPEB — потенцирующий связывание с *GRF1*-сайтом элемент-связывающий белок;
GRAS — общепризнанные как безопасные;
GRF1 — общий регуляторный фактор 1;
Msn2, Msn4 — мультикопийные супрессоры мутации *SNF1*, белки 2 и 4;
RAP1 — белок-активатор репрессора 1;
RPG — гены рибосомных белков;
STRE — элементы реакции на стресс;

TDH3 (GPD) — ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы;
TEF1 — ген фактора элонгации трансляции 1;
TPI1 — ген триозофосфатизомеразы 1;
TUF — трансляционный, находящийся перед геном, фактор;
UAS — активирующая нуклеотидная последовательность перед геном;
UASrpg — активирующая нуклеотидная последовательность перед генами рибосомных белков;
YPD — питательная среда, содержащая дрожжевой экстракт, пептон и декстрозу;
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография;
ВЭЖХ-МС — жидкостная хромато-масс-спектрометрия;
СЭ — система экспрессии;
УФ-излучение — ультрафиолетовое излучение.

ВВЕДЕНИЕ

Терапевтические белки вследствие специфичности, эффективности и безопасности приобретают все большее значение в профилактике и лечении заболеваний. С появлением технологии рекомбинантной ДНК для получения терапевтических белков используются различные системы экспрессии (СЭ) в бактериях, дрожжах, растениях и клетках млекопитающих [1–3]. В отличие от СЭ, в клетках млекопитающих дрожжи растут на недорогих питательных средах и легко поддаются генетическим манипуляциям. В отличие от прокариотической СЭ, дрожжевые клетки обладают эффективной системой секреции, что дает возможность получить правильно свернутый белок с большинством посттрансляционных модификаций, типичных для эукариотических клеток, и проводить менее затратную очистку целевого белка. Дрожжевые клетки не восприимчивы к фагам и эукариотическим вирусам, что является большим преимуществом для фармацевтической промышленности¹ [4]. Наиболее часто используемыми дрожжевыми клетками являются *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* и штаммы *Kluyveromyces* [4–6].

Вид *S. cerevisiae* является пионером среди дрожжей в получении рекомбинантных белков. Для редактирования полностью расшифрованного генома и метаболической инженерии штаммов *S. cerevisiae* доступно множество молекулярно-генетических инструментов [7], что делает *S. cerevisiae* перспективной системой экспрессии для получения различных рекомбинантных белков [8]. *S. cerevisiae* имеет статус GRAS, что ускоряет одобрение регуляторными

органами продуктов, полученных из дрожжей, и снимает ряд нормативных барьеров в процессе разработки биофармацевтических продуктов.

Таким образом, создание универсального дрожжевого штамма-производителя, соответствующего требованиям регуляторных органов и пригодного для производства различных рекомбинантных белков, остается актуальной задачей биотехнологии, так как единая платформа позволит сократить объем исследований и ускорит процесс выведения продукта на фармацевтический рынок.

Один из ключевых факторов, определяющих эффективность промышленного производства терапевтических белков — это высокая продуктивность штамма-производителя [9]. Количество синтезируемого рекомбинантного белка тесно коррелирует с удельной скоростью роста клеток, зависит от правильного сворачивания полипептидной цепи, дальнейшего перемещения белка внутри клетки и последующей секреции [6, 10]. В дрожжевых СЭ выбор источника углерода существенно влияет на продуктивность, при этом степень воздействия определяется характеристиками используемого промотора [11]. В большинстве случаев в СЭ, основанных на *S. cerevisiae*, применяются конститутивные промоторы, обеспечивающие стабильную экспрессию белка независимо от условий культивирования. Наиболее используемыми промоторами являются промоторы *TPI1*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4* и *TDH3 (GPD)* [12–22].

Ген *TPI* кодирует гликолитический фермент триозофосфат-изомеразу. Промотор *TPI1* содержит консервативную последовательность ACCCATCA, которая гомологична консенсусным

¹ Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. International council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use. ICH Q5A(R2). Geneva; 2022.

сайтам связывания регуляторных белков GRF1, RAP1 и TUF, а также обнаруживает сходство с регуляторными элементами других генов гликолитического пути. Наличие такой последовательности может объяснить высокий уровень экспрессии данного гена [23]. Штаммы с удаленным *TPI* не способны метаболизировать глюкозу [24].

Ген *TEF1* в *S. cerevisiae* отвечает за биосинтез eEF1 [25]. Комплекс eEF1 играет центральную роль в синтезе белка, доставляя аминокил-тРНК к рибосоме в процессе элонгации [26]. Гены *TEF* принадлежат к большому семейству генов *RPG*, кодирующих компоненты аппарата трансляции, которые скоординированно регулируются. Большинство дрожжевых *RPG* содержат UASrpg [27].

Ген алкогольдегидрогеназы 2 (*ADH2*) — один из многих генов дрожжей, экспрессия которых регулируется в зависимости от присутствия глюкозы в среде. Промотор *ADH2* очень удобен для использования при экспрессии гетерологичных генов, поскольку он обеспечивает сильный сигнал начала транскрипции, и транскрипция с промотора *ADH2* значимо подавляется в присутствии глюкозы в среде [28].

Цитозольные изоформы альдегиддегидрогеназы дрожжей кодируются генами *ALD2*, *ALD3* и *ALD6*, тогда как митохондриальные — генами *ALD4* и *ALD5* [29].

Элементы *STRE* и факторы транскрипции Msn2 и Msn4, по-видимому, опосредуют активацию генов в ответ на различные стрессы (тепловой шок, окислительный и осмотический стрессы), повреждение ДНК и голодание [30].

Продукт гена *GPD* (глицерин-3-фосфатдегидрогеназа) катализирует NADH-зависимое превращение DHAP в глицерин-3-фосфат. Активность промотора *GPD*, обусловленная двумя изоферментами Gpd1p и Gpd2p, важна для роста клеток в анаэробных условиях. Промотор гена *GPD* является самым сильным среди конститутивных промоторов *S. cerevisiae* [31–33].

Результаты сравнительных исследований влияния промоторов на экспрессию различных модельных белков (α -амилаза, сывороточный альбумин человека, зеленый флуоресцентный белок) описаны в работах [34–36]. На эффективность экспрессии влияет не только промотор, но и сам экспрессируемый белок [13, 21, 37–39]. На основании имеющихся данных не представляется возможным сделать однозначный вывод о превосходстве какого-либо типа промотора в отношении эффективности экспрессии гетерологичных белков в системе *S. cerevisiae*. Следовательно, актуально проведение сравнительного анализа по оценке влияния

промоторов на экспрессию различных рекомбинантных белков. Стоит отметить, что подобное исследование не проводилось в отношении большинства терапевтических белков, экспрессируемых в дрожжевых системах экспрессии. В частности, изучено влияние нескольких промоторов на экспрессию проинсулина, но сравнительный анализ различных промоторов в рамках одного исследования не проводился [40]. Использование промоторной последовательности *TPI1* для контроля экспрессии позволяет достичь продуктивности 80 мг/л [8, 41, 42] и 112 мг/л [43]. Использование промотора *CIT1* привело к увеличению выхода проинсулина на 80% в сравнении с контролем (промотор *TPI1*) [44]. При использовании промотора *TPI1* удалось достичь максимального выхода проинсулина (90 мг/л), в то время как в случае промотора *TEF1* выход составлял 2,5 мг/л [36].

Результаты проведенных исследований не позволяют с уверенностью ранжировать промоторы по транскрипционной активности для экспрессии проинсулина, потому что уровень экспрессии зависит от транскрипционной и трансляционной регуляции. В связи с этим при конструировании дрожжевых штаммов-продуцентов значение имеет рациональный подбор генетических элементов СЭ для достижения максимальной продуктивности.

Нами было выбрано пять промоторов: *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3 (GPD)*, *TPI1*, которые чаще всего используются для экспрессии рекомбинантных белков в дрожжах. Выбор этих промоторов обусловлен доказанной эффективностью применения в биотехнологии, что позволяет провести обоснованное сравнение их эффективности в контексте экспрессии терапевтических белков и выявить наиболее подходящие промоторы для дальнейших исследований.

Цель работы — оценить влияние промоторов *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3 (GPD)*, *TPI1* на экспрессию рекомбинантного проинсулина человека в *Saccharomyces cerevisiae* и ранжировать их по силе для выбора оптимального промотора, обеспечивающего максимальную продуктивность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовали диплоидный штамм *Saccharomyces cerevisiae* YS3, который был получен путем слияния гаплоидных клеток *S. cerevisiae* (*MATalpha pep4::HIS3 prb1-delta1.6R his3-delta200 ura3-52 gal2 can1 tpi::URA3*) и *S. cerevisiae* (*MATa ura3-52 trp1 lys2-801 leu2-delta1 his3-delta200 pep4::HIS3 prb1-delta1.6R can1 GAL tpi::KanR*).

В качестве вектора для создания экспрессионных конструкций использовали челночную плазмиду pRS425 (ATCC, США), содержащую маркер устойчивости к ампициллину, а также точки начала репликации (ориджин) pUC и 2- μ m (рис. 1). Ген предшественника человеческого инсулина с сигнальным пептидом был синтезирован искусственно (ATUM, США) и клонирован в вектор с использованием рестрикционных сайтов *Sall* и *SpeI*. Последовательности промоторов и терминаторов транскрипции были получены синтетическим путем (ATUM, США). Последовательности промотора и терминатора гена *TPI1* были клонированы рестрикционно-лигазным методом с использованием рестриктаз *SacI* и *BamHI*; последовательность промотора *TEF1* – *SacI/BglII*; *ADH2* – *BspMI/BglII*; *ALD4* и *TDH3* – *SacI/BglII*.

Трансформацию штамма-хозяина YS3 плазмидой проводили с помощью электропорации [45]. В итоге были получены штаммы-продуценты *S. cerevisiae* YS3/pF1145, YS3/pF1157, YS3/pF1199, YS3/pF1200, YS3/pF1201, содержащие промоторы *TPI1*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3* соответственно. Из-за наличия ориджина 2- μ m плазмиды реплицировались в клетках дрожжей без интеграции в геном. Для верификации сконструированных штаммов проводили амплификацию целевых участков методом ПЦР и последующее секвенирование (ЗАО «Евроген», Россия).

Методы

Культивирование штаммов-продуцентов

***S. cerevisiae* в колбах.** В экспериментах использовали стандартную жидкую питательную среду YPD1, содержащую 1% глюкозы [46], а для получения посевного материала – агаризованную среду YPD2, содержащую 2% глюкозы [46]. Инкубацию на агаризованной среде YPD2 проводили в термостате при 30 °C в течение 72 ч. Сформированные колонии смывали жидкой средой YPD1 и переносили в стерильные колбы объемом 100 мл, которые содержали 15 мл той же среды. Культуры инкубировали в среде YPD1 при 30 °C и перемешивании при 210 об/мин в течение 42 ч. В точках роста 18, 24 и 42 ч проводили отбор проб для измерения оптической плотности, содержания белка и этанола в культуральной жидкости.

Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре NanoPhotometer P300 (Implen, Германия). Начальная оптическая плотность клеток при инокуляции составила 0,2–0,5 при длине волны 600 нм.

Уровень глюкозы контролировали с помощью глюкометра Contour TS (Ascensia Diabetes Care, Швейцария) и при необходимости доводили концентрацию глюкозы до 1% с помощью 40%-го рабочего раствора глюкозы.

Подготовка посевного материала для ферментации в биореакторе. В качестве исходного

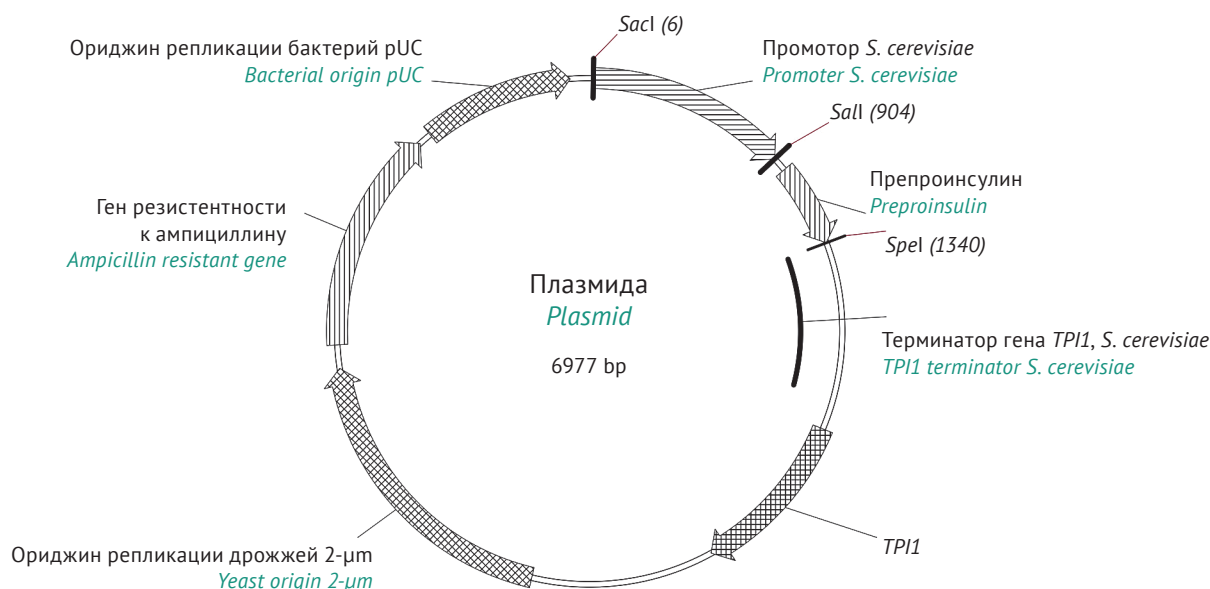


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным с использованием программного обеспечения Vector NTI 10 (Thermo Fisher Scientific, США) / The figure is prepared by the authors using their own data on Vector NTI 10 software (Thermo Fisher Scientific, USA)

Рис. 1. Схема экспрессионной конструкции на основе вектора pRS425 с клонированными альтернативными промоторами и терминаторами транскрипции.

Fig. 1. Expression construct based on the pRS425 vector with cloned alternative promoters and transcription terminators.

материала для подготовки посевной культуры использовали предварительные клеточные банки штаммов YS3/pF1145 (*TPI1*) и YS3/pF1145 (*TDH3*). Клетки инокулировали в 300 мл жидкой среды соответствующего состава без добавления глюкозы [41] и инкубировали при 30 ± 1 °C в шейкер-инкубаторе Ecotron (Infors HT, Швейцария) при 210 об/мин в течение 66–72 ч.

Культивирование в биореакторе. Основной этап культивирования штаммов-продуцентов проводили в течение 96 ч в лабораторных ферментерах Multifors (Infors HT, Швейцария). Состав питательной среды и параметры процесса были выбраны на основе ранее выполненной оптимизации с использованием методологии Design of Experiments для дрожжевых СЭ [41]. Во время ферментации периодически отбирали пробы культуральной жидкости для определения содержания клеточной биомассы, этанола и проинсулина.

Определение массы влажного осадка клеток проводили следующим образом: 2 мл клеточной суспензии переносили в заранее тарированные микропробирки и центрифугировали в течение 5 мин при 15000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5424 (Eppendorf, Германия). Супернатант переносили в чистые пробирки для дальнейшего определения содержания этанола и проинсулина.

Определение молекулярной массы рекомбинантного проинсулина в культуральной жидкости проводили методом ВЭЖХ-МС, используя систему Acquity UPLC (Waters, США) с масс-спектрометрическим детектором. Разделение компонентов проводили на колонке SunFire™ C18 (5 мкм, 150×4,6 мм) (Waters, США) с регистрацией сигнала при длине волны 214 нм.

В качестве подвижных фаз использовали фазу А (89,9% вода, 10% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) и фазу В (99,9% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота). Поток подвижной фазы поддерживали на уровне 0,9 мл/мин. Элюирование проводили в градиентном режиме: увеличение концентрации фазы В от 0 до 75% за 18 мин, затем от 75 до 100% за 1 мин с последующим возвращением к исходному составу за 1 мин.

Детектирование осуществляли в режиме положительной ионизации с анализом массы ионов в диапазоне 300–3000 *m/z*. Каждую серию анализов начинали и завершали введением холостой пробы, в качестве которой использовалась вода для хроматографии, в целях предотвращения перекрестной контаминации. В качестве контрольного образца использовали референсный стандарт инсулина (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия).

Определение содержания проинсулина в культуральной жидкости определяли методом ВЭЖХ с использованием системы Acquity UPLC (Waters, США), оснащенной диодно-матричным детектором. Разделение компонентов проводили на колонке SunFire™ C18 (5 мкм, 150×4,6 мм) (Waters, США) с регистрацией сигнала при длине волны 214 нм. В качестве фазы А использовали 3% водный раствор натрия перхлората моногидрата, фазы В – 78% ацетонитрил. Хроматографирование проводили при скорости потока 0,9 мл/мин с использованием градиентной программы: увеличение концентрации фазы В от 20 до 40% за 20 мин, затем от 40 до 95% за 5 мин с последующим возвращением к исходному составу за 1 мин. Количественное определение проводили по калибровочному графику. Калибровка была произведена с использованием стандартного образца инсулина (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия).

Анализ внеклеточного метаболита этанола в культуральной жидкости проводили методом газовой хроматографии с использованием хроматографа Agilent 7890A (Agilent Technologies, США), оборудованного пламенно-ионизационным детектором, системой парового ввода проб (Agilent 7694E), а также капиллярной колонкой HP FFAP (50 м×0,32 мм×0,5 мкм). Калибровка была произведена с использованием стандартного раствора изопропанола (ООО «Экротекс», Россия) с чистотой $\geq 99,5\%$.

Для анализа в паровые флаконы объемом ~10 мл вносили 1,7 мл предварительно размороженной культуральной жидкости, после чего флаконы герметично закрывали металлическими крышками с силиконовыми прокладками. Пробы инкубировали в пробоотборнике при 85 °C в течение 15 мин, после чего осуществляли забор паровой фазы и ее введение в хроматограф.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., США). Для выявления статистически значимых различий между штаммами по анализируемым показателям применяли дисперсионный анализ. Взаимосвязи между количественными параметрами оценивали с помощью парного корреляционного анализа по методу Пирсона отдельно для каждого исследуемого штамма. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение штаммов-продуцентов проинсулина

Были получены дрожжевые штаммы-продуценты *S. cerevisiae* YS3/pF1145, YS3/pF1199,

YS3/pF1157, YS3/pF1200, YS3/pF1201, в которых экспрессия проинсулина находилась под контролем дрожжевых нативных конститутивных промоторов *TPI1*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3* соответственно.

Подтверждение подлинности продукта проводилось с использованием ВЭЖХ-МС. Экспериментальная масса проинсулина, обнаруженная в культуральной жидкости, имела то же значение, что и экспериментальная масса стандартного образца (рис. 2). Так как аминокислотная последовательность проинсулина не имеет сайтов гликозилирования, на хроматограммах отсутствовали различающиеся по массе гликоформы.

Анализ показателей продуктивности и роста штаммов-продуцентов проинсулина

В рамках предварительной оценки полученных штаммов при культивировании в колбах исследовали параметры роста биомассы, накопления этанола и рекомбинантного белка. В качестве контроля использовался штамм YS3/pF1145, экспрессия проинсулина в котором находилась под контролем промотора *TPI1*. Последовательность данного промотора является «золотым стандартом» для экспрессии рекомбинантных белков в *S. cerevisiae* [36].

Оценка накопления биомассы штаммами-продуцентами. На рисунке 3 представлена динамика накопления биомассы различными штаммами-продуцентами при культивировании в течение 42 ч.

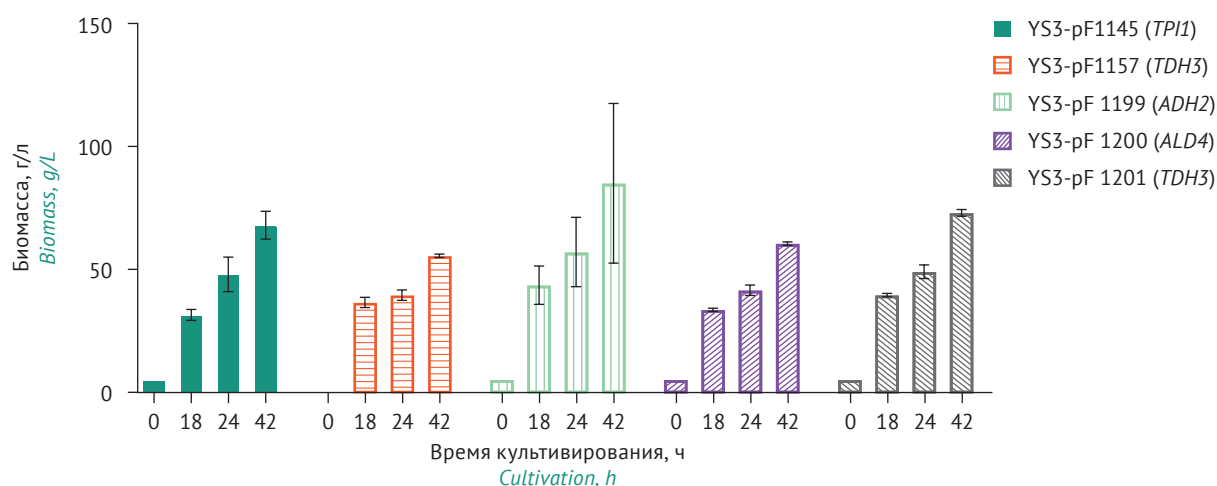


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., США) / The figure is prepared by the authors using their own data on GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software Inc., USA)

Рис. 3. Динамика роста биомассы различных штаммов-продуцентов *S. cerevisiae* при культивировании в течение 42 ч. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Средние значения нормированы относительно значений в точке «18 ч» (штамм YS3/pF1145).

Fig. 3. Wet cell accumulation dynamics of different *S. cerevisiae* producer strains during 42-hour cultivation. The data are represented as the mean value $\pm$ standard deviation ($n=3$). The mean values are normalised to the 18-hour time point of strain YS3/pF1145.

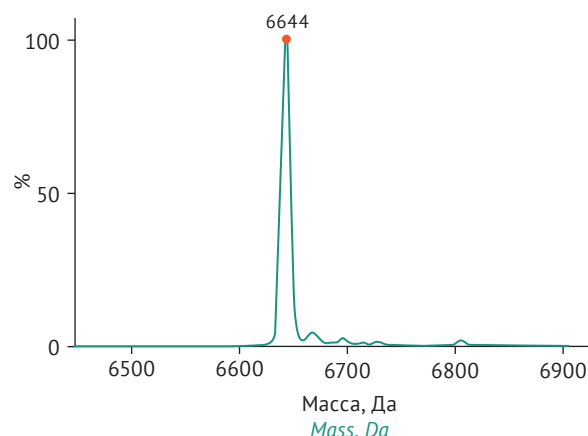


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным с использованием программного обеспечения UniDec v.5.0.1 [47] / The figure is prepared by the authors using their own data on UniDec software v.5.0.1 [47]

Рис. 2. Пример типового ВЭЖХ-МС спектра образца культуральной жидкости штаммов-продуцентов проинсулина *S. cerevisiae*. По оси X обозначена масса проинсулина (Да), по оси Y — относительная интенсивность сигнала (% от максимального значения). Оригинальное изображение спектра экспортировано из программы UniDec v.5.0.1.

Fig. 2. Example of typical HPLC-MS of a sample spectrum of cultural medium from proinsulin *S. cerevisiae* producer strains. X-axis, proinsulin mass (Da); Y-axis, relative signal intensity (% of the maximal value). The original image was imported from UniDec software v.5.0.1.

Анализ результатов показал, что все исследуемые штаммы-продуценты демонстрировали схожую динамику роста на протяжении всего процесса культивирования в колбах. Штаммы различались по титру клеток через 42 ч культивирования при одинаковой плотности посева

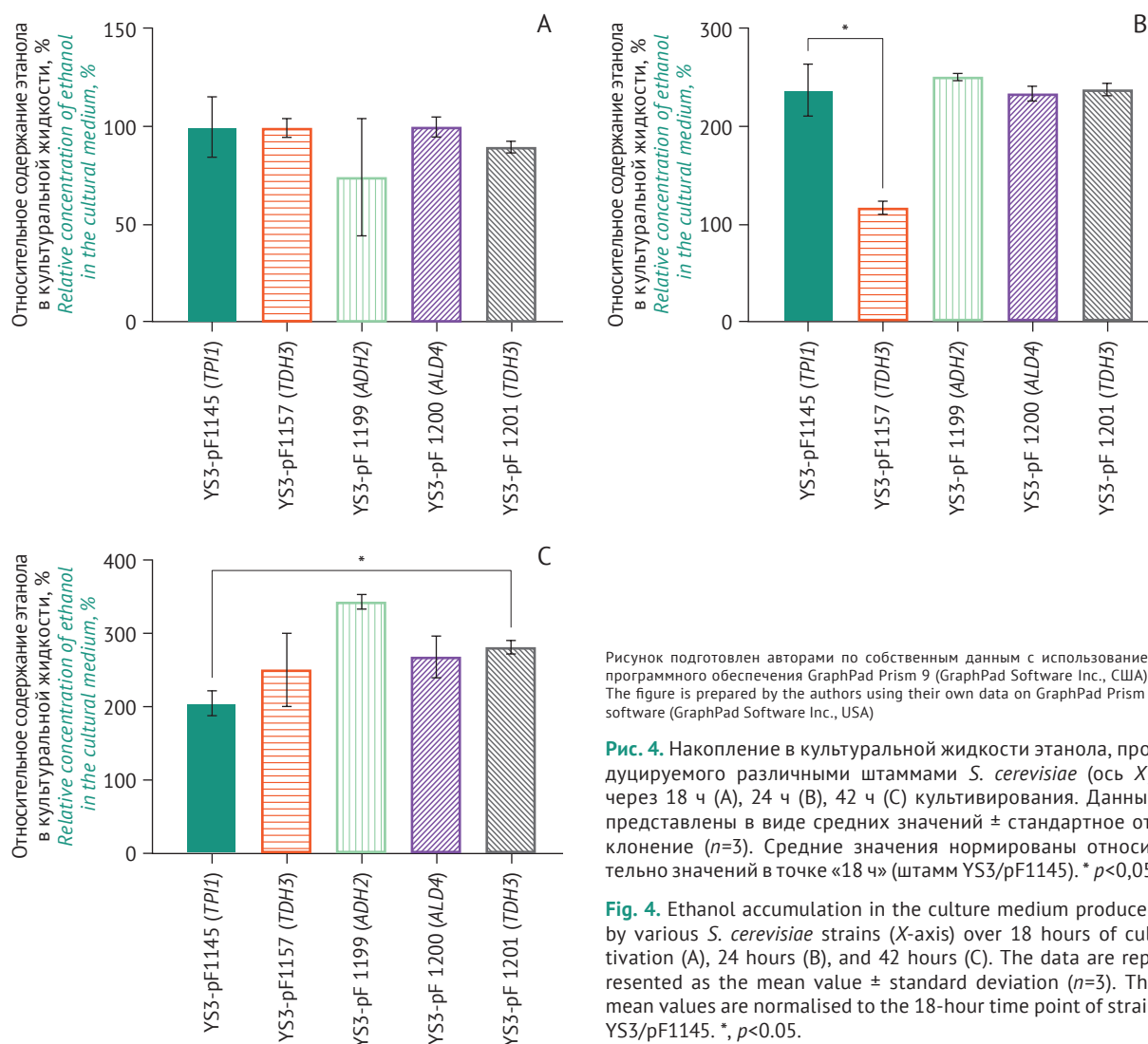


Рис. 4. Накопление в культуральной жидкости этанола, продуцируемого различными штаммами *S. cerevisiae* (ось X), через 18 ч (A), 24 ч (B), 42 ч (C) культивирования. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Средние значения нормированы относительно значений в точке «18 ч» (штамм YS3/pF1145). * $p<0.05$.

Fig. 4. Ethanol accumulation in the culture medium produced by various *S. cerevisiae* strains (X-axis) over 18 hours of cultivation (A), 24 hours (B), and 42 hours (C). The data are represented as the mean value $\pm$ standard deviation ($n=3$). The mean values are normalised to the 18-hour time point of strain YS3/pF1145. *, $p<0.05$.

(5 г/л). Штаммы-продуценты YS3/pF1201 (*TDH3*) и YS3/pF1145 (*TPI1*) через 42 ч культивирования накапливали биомассу ≈ 35 г/л; YS3/pF1200 (*ALD4*) и YS3/pF1157 (*TEF1*) – ≈ 30 г/л; YS3/pF1199 (*ADH2*) – 42 г/л. Значения биомассы штамма-продуцента YS3/pF1199 (*ADH2*) значительно варьировались в двух точках (24 и 42 ч), что, возможно, связано с некоторой разницей плотности посева клеток.

Оценка накопления этанола штаммами-продуцентами. На рисунке 4 представлена сравнительная оценка накопления этанола различными штаммами-продуцентами в ходе культивирования. Все измеренные значения были нормированы по отношению к штамму YS3/pF1145 (*TPI1*) на соответствующем временном интервале.

Практически все штаммы-продуценты (рис. 4) увеличивали содержание этанола в культуральной жидкости. Самые низкие значения содержания этанола через 42 ч культивирования наблюдались для контрольного штамма-продуцента

YS3/pF1145 (*TPI1*), тогда как максимальное накопление этанола было характерно для YS3/pF1199 (*ADH2*) через 42 ч культивирования и составляло 0,96% (табл. 1). Через 42 ч культивирования содержание этанола составило 0,7–0,8% в случаях остальных штаммов-продуцентов. *t*-тест показал, что статистически значимых различий между штаммами по накоплению этанола не наблюдалось. Для штамма-продуцента YS3/pF1157 (*TEF1*) накопление биомассы коррелировало с содержанием этанола в среде ($p=0,032$).

Оценка накопления проинсулина штаммами-продуцентами. Уровни накопления проинсулина, продуцируемого различными штаммами-продуцентами (измеренные значения пересчитаны относительно YS3/pF1145 (*TPI1*) для каждой временной точки при культивировании), показаны на рисунке 5.

Наименьшие значения удельной продуктивности в сравнении с остальными штаммами были характерны для контрольного

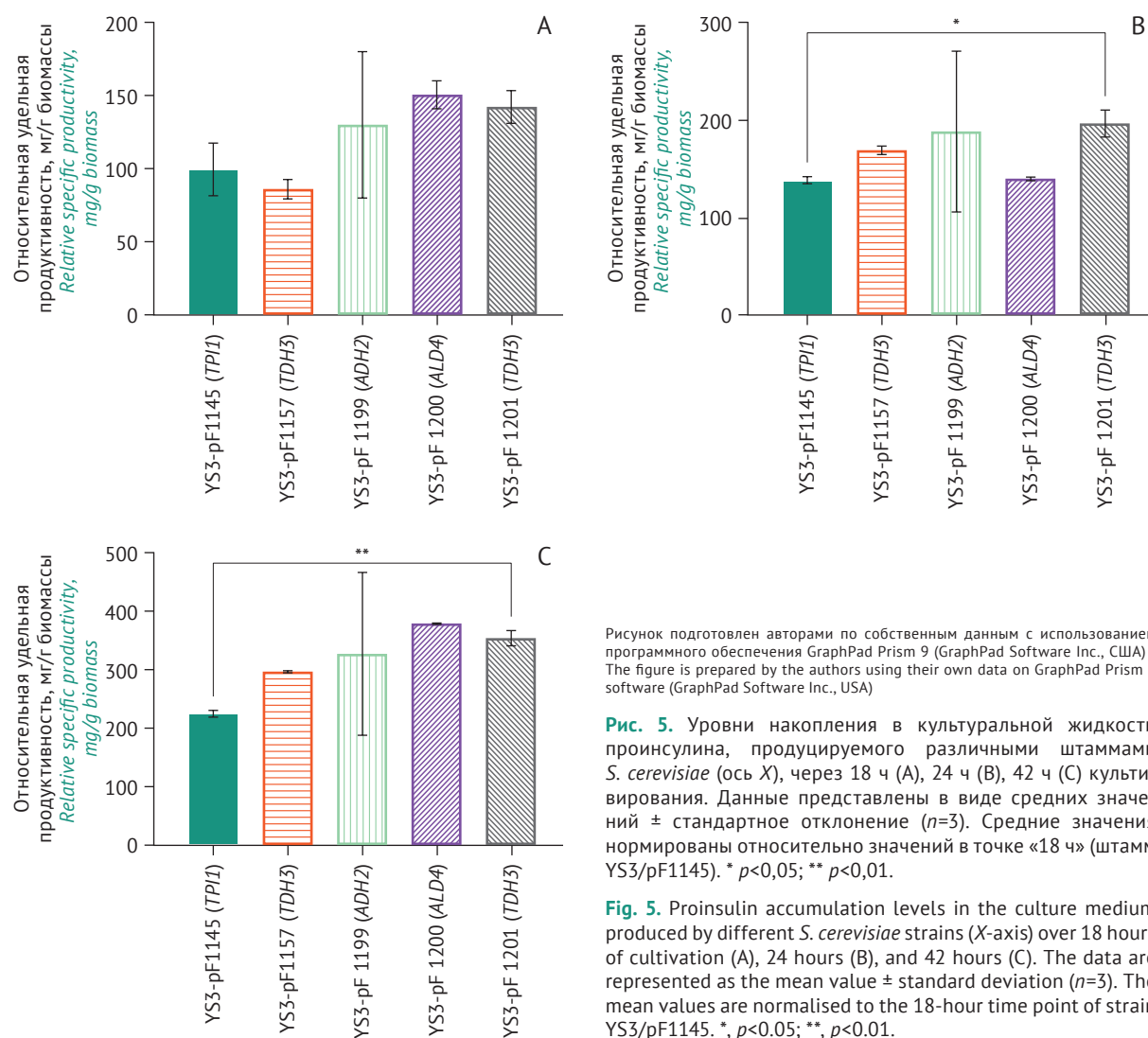


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., США) / The figure is prepared by the authors using their own data on GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software Inc., USA)

Рис. 5. Уровни накопления в культуральной жидкости проинсулина, продуцируемого различными штаммами *S. cerevisiae* (ось X), через 18 ч (А), 24 ч (В), 42 ч (С) культивирования. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Средние значения нормированы относительно значений в точке «18 ч» (штамм YS3/pF1145). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

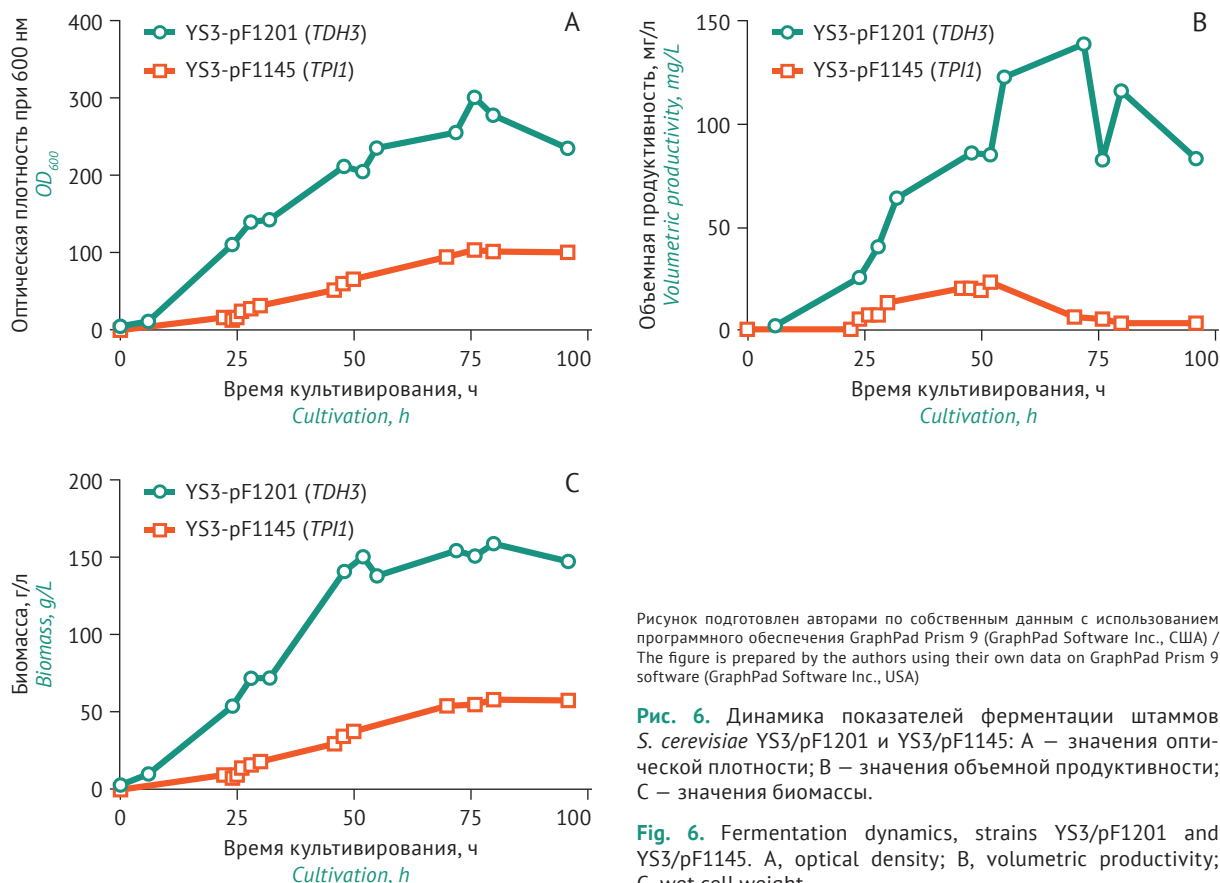
Fig. 5. Proinsulin accumulation levels in the culture medium produced by different *S. cerevisiae* strains (X-axis) over 18 hours of cultivation (A), 24 hours (B), and 42 hours (C). The data are represented as the mean value $\pm$ standard deviation ($n=3$). The mean values are normalised to the 18-hour time point of strain YS3/pF1145. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

штамма YS3/pF1145 (*TPI1*) через 42 ч культивирования. Максимальный выход проинсулина у штамма-продуцента YS3/pF1200 (*ALD4*) составил $16,59 \pm 0,02$ мг/л (табл. 1) при $0,55 \pm 0,01$ мг/г биомассы через 42 ч культивирования. Штамм YS3/pF1201 (*TDH3*) при объемной продуктивности $15,51 \pm 0,57$ мг/л характеризовался низкой

удельной продуктивностью ($0,43 \pm 0,02$ мг/г биомассы), тогда как штамм YS3/pF1157 (*TEF1*) при низкой объемной продуктивности $12,98 \pm 0,08$ мг/л характеризовался высокой удельной продуктивностью ($0,470 \pm 0,003$ мг/г биомассы). Большая величина стандартного отклонения уровней накопления биомассы и целевого

Таблица 1. Сравнение продуктивности и характеристик роста штаммов-продуцентов проинсулина *S. cerevisiae*
Table 1. Comparison of productivity and growth characteristics of proinsulin *S. cerevisiae* producer strains

Штамм Strain	Промотор Promoter	Накопление биомассы, г/л Biomass accumulation, g/L	Содержание проинсулина, мг/л Proinsulin content, mg/L	Содержание этанола, % Ethanol content, %
YS3/pF1145	<i>TPI1</i>	$34,00 \pm 2,83$	$9,85 \pm 0,25$	$0,58 \pm 0,05$
YS3/pF1157	<i>TEF1</i>	$27,75 \pm 0,35$	$12,98 \pm 0,08$	$0,70 \pm 0,14$
YS3/pF1199	<i>ADH2</i>	$42,50 \pm 16,26$	$14,32 \pm 6,11$	$0,96 \pm 0,03$
YS3/pF1200	<i>ALD4</i>	$30,25 \pm 0,35$	$16,59 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,08$
YS3/pF1201	<i>TDH3</i>	$36,50 \pm 0,71$	$15,51 \pm 0,57$	$0,79 \pm 0,03$



продукта (проинсулин) для штамма-продуцента YS3/pF1199 (*ADH2*), возможно, связана с некоторой разницей плотности посева клеток.

Для штаммов-продуцентов YS3/pF1199 (*ADH2*) и YS3/pF1201 (*TDH3*) отмечена зависимость между выходом рекомбинантного проинсулина и накоплением биомассы ($p=0,020$ и $p=0,019$ соответственно). Однако для всех штаммов-продуцентов не наблюдалось статистически значимой корреляции между выходом проинсулина и содержанием этанола или накоплением биомассы. Сравнение показателей продуктивности и характеристик роста исследуемых штаммов на момент завершения культивирования представлено в таблице 1.

Согласно полученным экспериментальным данным, промоторы по их силе для экспрессии проинсулина можно распределить в следующем ряду: *TDH3* ≈ *ALD4* > *ADH2* > *TEF1* > *TPI1* (табл. 1). По данным литературы, промотор *TDH3* считается одним из самых сильных, однако ранее это не было показано для проинсулина [31–33]. Экспрессия проинсулина под контролем промотора *TEF1* была ниже по сравнению с *TPI1*, что объяснялось высокой скоростью распада мРНК [36]. Такое расхождение с данными литературы может быть обусловлено влиянием других структурных

элементов экспрессионной конструкции и особенностями проведения эксперимента.

Таким образом, для дальнейшей работы был выбран штамм YS3/pF1201 (*TDH3*) по причине его высокой продуктивности и благоприятной динамики накопления биомассы. Штамм YS3/pF1200 (*ALD4*) характеризовался не меньшей продуктивностью, но низким уровнем накопления биомассы.

Исследование ферментации штаммов-продуцентов в лабораторном биореакторе

Для штамма YS3/pF1201 (*TDH3*) был получен предварительный банк клеток и проведена ферментация в лабораторном биореакторе. В качестве контроля была поставлена ферментация штамма YS3/pF1145 (*TPI1*) в аналогичных условиях. Результаты, полученные в процессе ферментации, представлены на рисунке 6.

Стационарная фаза роста штамма YS3/pF1201 (*TDH3*) наблюдалась через 50 ч культивирования, максимальное накопление проинсулина наблюдалось через 72 ч культивирования. В выбранных условиях ферментации максимальное значение продуктивности составляло 139,17 мг/л при значении биомассы 154,5 г/л. Стационарная фаза роста контрольного штамма YS3/pF1445

(*TPI1*) наблюдалось через 72 ч культивирования, при этом максимальное значение продуктивности (23 мг/л) было достигнуто через 50 ч культивирования, после чего данный показатель снижался.

Таким образом, для штамма YS3/pF1201 (*TDH3*) наблюдались более высокие значения продуктивности и накопления биомассы по сравнению с контрольным штаммом YS3/pF1145 (*TPI1*). Это может быть связано с тем, что экспрессия проинсулина штаммом YS3/pF1201 (*TDH3*) в меньшей степени репрессируется глюкозой.

ВЫВОДЫ

1. Получены штаммы *S. cerevisiae*, в которых экспрессия проинсулина находится под контролем промоторов *TPI*, *TEF1*, *ADH2*, *ALD4*, *TDH3*.

2. Промоторы по их силе для экспрессии проинсулина можно распределить в ряду *TDH3* > *ALD4* > *ADH2* > *TEF1* > *TPI1*.

3. Максимальные значения показателей накопления биомассы и выхода проинсулина были установлены для штамма *S. cerevisiae* YS3/pF1201, в котором экспрессия проинсулина осуществлялась под контролем промотора *TDH3*.

Спустя 42 ч после начала культивирования концентрация проинсулина в культуральной жидкости достигала $15,51 \pm 0,57$ мг/л при удельной продуктивности $0,43 \pm 0,02$ мг/г.

4. В процессе ферментации в лабораторном биореакторе продуктивность штамма *S. cerevisiae* YS3/pF1201 (*TDH3*) достигала 139,17 мг/л через 72 ч после начала культивирования при значении биомассы 154,5 г/л. Данный показатель в 6,1 раза превышал продуктивность штамма с классическим промотором *TPI1*, который используется для получения инсулинов.

5. Ограничением проведенного исследования является то, что сравнительная оценка активности промоторов была выполнена лишь для пяти конститутивных последовательностей в стандартных лабораторных условиях и в рамках одной экспрессионной конструкции без модификации других регуляторных элементов. Для подтверждения промышленной применимости полученных результатов требуется исследовать влияние параметров культивирования на продуктивность штамма-продуцента и стабильность экспрессии, а также осуществить масштабирование процесса культивирования.

Литература/References

1. Navarrete C, Jacobsen IH, Martínez JL, Procentese A. Cell factories for industrial production processes: Current issues and emerging solutions. *Processes*. 2020;8(7):768. <https://doi.org/10.3390/pr8070768>
2. Slathia PS, Sagrika Sharma E, Khan IA, et al. Recombinant production of therapeutic proteins. In: Singh DB, Tripathi T, eds. *Protein-based therapeutics*. Springer, Singapore; 2023. P. 101–29. https://doi.org/10.1007/978-981-19-8249-1_4
3. Gomes AR, Byregowda SM, Veeragowda BM, Balamurugan V. An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. *Adv Anim Vet Sci*. 2016;4(7):346–56. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356>
4. Celik E, Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv*. 2012;30(5):1108–18. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.011>
5. Huang M, Wang G, Qin J, et al. Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115(47):E11025–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809921115>
6. Madhavan A, Arun KB, Sindhu R, et al. Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. *Microb Cell Fact*. 2021;20(1):124. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z>
7. Zhao M, Ma J, Zhang L, Qi H. Engineering strategies for enhanced heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*. 2024;23:32. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02299-z>
8. Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast. *Bioengineered*. 2013;4(4):207–11. <https://doi.org/10.4161/bioe.22856>
9. Zepeda AB, Pessoa Jr A, Farias JG. Carbon metabolism influenced for promoters and temperature used in the heterologous protein production using *Pichia pastoris* yeast. *Braz J Microbiol*. 2018;49 Suppl 1:119–27. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.03.010>
10. Schenk J, Balazs K, Jungo C, et al. Influence of specific growth rate on specific productivity and glycosylation of a recombinant avidin produced by a *Pichia pastoris* Mut+ strain. *Biotechnol Bioeng*. 2008;99(2):368–77. <https://doi.org/10.1002/bit.21565>
11. Maury J, Kannan S, Jensen NB, et al. Glucose-dependent promoters for dynamic regulation of metabolic pathways. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:63. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00063>
12. Li S, Ma L, Fu W, et al. Programmable synthetic upstream activating sequence library for fine-tuning gene expression levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*. 2022;11(3):1228–39. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00511>
13. Deng J, Wu Y, Zheng Z, et al. A synthetic promoter system for well-controlled protein expression with different carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*. 2021;20:202. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01691-3>
14. Liu R, Liu L, Li X, et al. Engineering yeast artificial core promoter with designated base motifs. *Microb Cell Fact*. 2020;19(1):38. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01305-4>
15. Tang H, Wu Y, Deng J, et al. Promoter architecture and promoter engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolites*. 2020;10(8):320. <https://doi.org/10.3390/metabo10080320>
16. He S, Zhang Z, Lu W. Natural promoters and promoter engineering strategies for metabolic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2023;50(1):kuac029 <https://doi.org/10.1093/jimb/kuac029>
17. Otto DS, Rudolf F. Constitutive and regulated promoters in yeast: how to design and make use of promoters in *S. cere-*

- visiae*. In: Smolke C, Lee SY, Nielsen J, Stephanopoulos G, eds. *Synthetic biology. Parts, devices and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2018. P. 107–30.
<https://doi.org/10.1002/9783527688104.ch6>
18. Myburgh MW, Schwerdtfeger KS, Cripwell RA, et al. Promoters and introns as key drivers for enhanced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Gadd GM, Sariaslani S, eds. *Advances in applied microbiology*. Academic Press; 2023. P. 1–29.
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2023.07.002>
19. Feng X, Marchisio MA. *Saccharomyces cerevisiae* promoter engineering before and during the synthetic biology era. *Biology (Basel)*. 2021;10(6):504.
<https://doi.org/10.3390/biology10060504>
20. Peng B, Williams TC, Henry M, et al. Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a comparison of yeast promoter activities. *Microb Cell Fact*. 2015;14:91.
<https://doi.org/10.1186/s12934-015-0278-5>
21. Partow S, Siewers V, Bjørn S, et al. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2010;27(11):955–64.
<https://doi.org/10.1002/yea.1806>
22. Sun J, Shao Z, Zhao H, et al. Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(8):2082–92.
<https://doi.org/10.1002/bit.24481>
23. Scott EW, Allison HE, Baker HV. Characterization of *TPI* gene expression in isogenic wild-type and *gcr1*-deletion mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(23):7099–107.
<https://doi.org/10.1093/nar/18.23.7099>
24. Compagno C, Brambilla L, Capitanio D, et al. Alterations of the glucose metabolism in a triose phosphate isomerase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Yeast*. 2001;18(7):663–70.
<https://doi.org/10.1002/yea.715>
25. Vignais ML, Huet J, Buhler JM, Sentenac A. Contacts between the factor TUF and RPG sequences. *J Biol Chem*. 1990;265(24):14669–74.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)77354-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)77354-7)
26. Munshi R, Kandl K, Carr-Schmid A, et al. Overexpression of translation elongation factor 1A affects the organization and function of the actin cytoskeleton in yeast. *Genetics*. 2001;157(4):1425–36.
<https://doi.org/10.1093/genetics/157.4.1425>
27. Bi X, Broach JR. *UASrpg* can function as a heterochromatin boundary element in yeast. *Genes Dev*. 1999;13(9):1089–101.
<https://doi.org/10.1101/gad.13.9.1089>
28. Price VL, Taylor WE, Clevenger W, et al. Expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae* using the *ADH2* promoter. *Methods Enzymol*. 1990;185:308–18.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85027-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85027-1)
29. Saint-Prix F, Bönquist L, Dequin S. Functional analysis of the *ALD* gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology (Reading)*. 2004;150(Pt 7):2209–20.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.26999-0>
30. Navarro-Aviño JP, Prasad R, Miralles VJ, et al. A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible *ALD2* and *ALD3* genes. *Yeast*. 1999;15(10A):829–42.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0061\(199907\)15:10a<829::Aid-yea423>3.0.Co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(199907)15:10a<829::Aid-yea423>3.0.Co;2-9)
31. Kjeldsen T, Balschmidt P, Diers I, et al. Expression of insulin in yeast: the importance of molecular adaptation for secretion and conversion. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2001;18:89–121.
<https://doi.org/10.1080/02648725.2001.10648010>
32. Redden H, Alper HS. The development and characterization of synthetic minimal yeast promoters. *Nat Commun*. 2015;6:7810.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8810>
33. Yagi S, Yagi K, Fukuoka J, Suzuki M. The UAS of the yeast *GAPDH* promoter consists of multiple general functional elements including RAP1 and GRF2 binding sites. *J Vet Med Sci*. 1994;56(2):235–44.
<https://doi.org/10.1292/jvms.56.235>
34. Hitzeman RA, Chen CY, Dowbenko DJ, et al. Use of heterologous and homologous signal sequences for secretion of heterologous proteins from yeast. *Methods Enzymol*. 1990;185:421–40.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85037-o](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85037-o)
35. Kaishima M, Ishii J, Matsuno T, et al. Expression of varied GFPs in *Saccharomyces cerevisiae*: codon optimization yields stronger than expected expression and fluorescence intensity. *Sci Rep*. 2016;6:35932.
<https://doi.org/10.1038/srep35932>
36. Liu Z, Tyo KE, Martínez JL, et al. Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(5):1259–68.
<https://doi.org/10.1002/bit.24409>
37. Myburgh MW, Rose SH, Viljoen-Bloom M. Evaluating and engineering *Saccharomyces cerevisiae* promoters for increased amylase expression and bioethanol production from raw starch. *FEMS Yeast Res*. 2020;20(6):foaa047.
<https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa047>
38. Reider Apel A, d'Espaux L, Wehrs M, et al. A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(1):496–508.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1023>
39. Zhang J, Cai Y, Du G, et al. Evaluation and application of constitutive promoters for cutinase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol*. 2017;55:538–44.
<https://doi.org/10.1007/s12275-017-6514-4>
40. Kjeldsen T, Andersen AS, Hubálek F, et al. Molecular engineering of insulin for recombinant expression in yeast. *Trends Biotechnol*. 2024;42(4):464–78.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.09.012>
41. Хасаншина ЗР, Лунев ИС, Филипенко АА и др. Оптимизация условий культивирования штамма *Saccharomyces cerevisiae* – продуцента проинсулина. *Биотехнология*. 2022;38(3):35–48. Khasanshina ZR, Lunev IS, Filipenko AA, et al. Optimization of cultivation condition for the *Saccharomyces cerevisiae* strain producing proinsulin. *Russian Journal of Biotechnology*. 2022;38(3):35–48 (In Russ.).
<https://doi.org/10.56304/S0234275822030036>
42. Kjeldsen T. Yeast secretory expression of insulin precursors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000;54(3):277–86.
<https://doi.org/10.1007/s002530000402>
43. Kazemi Seresht A, Nørgaard P, Palmqvist EA, et al. Modulating heterologous protein production in yeast: the applicability of truncated auxotrophic markers. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(9):3939–48.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4263-1>
44. Andersen AS, Diers I. Production of heterologous polypeptides in yeast. 2005. US patent US6861237B2.
<https://patents.google.com/patent/US6861237B2/en>
45. Grey M, Brendel M. A ten-minute protocol for transforming *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Curr Genet*. 1992;22(4):335–6.
<https://doi.org/10.1007/bf00317931>
46. Corbacho I, Teixidó F, Velázquez R, et al. Standard YPD, even supplemented with extra nutrients, does not always compensate growth defects of *Saccharomyces*

cerevisiae auxotrophic strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011;99(3):591–600.
<https://doi.org/10.1007/s10482-010-9530-5>
47. Marty MT, Baldwin AJ, Marklund EG, et al. Bayesian de-

convolution of mass and ion mobility spectra: from binary interactions to polydisperse ensembles. *Anal Chem*. 2015;87(8):4370–6.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00140>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.А. Буслаева** — идея, планирование и проведение экспериментов, анализ данных, написание текста рукописи; **З.Р. Хасаншина** — планирование и анализ данных эксперимента, написание текста рукописи; **И.А. Корнаков** — проведение экспериментов по культивированию; **М.П. Коробкина** — проведение высокоэффективной жидкостной хроматографии; **В.И. Шмурак** — проведение хромато-масс-спектрометрии; **Р.В. Драй** — определение основного направления исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Благодарности. Исследование проводилось при спонсорской поддержке ООО «ГЕРОФАРМ». Авторы выражают признательность коллегам, которые оказывали помощь в выполнении исследования, сотрудникам лаборатории генной инженерии и ферментации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.A. Buslaeva** suggested the study idea, planned and carried out experiments; analysed data; and drafted the manuscript. **Z.R. Khasanshina** conceptualised, planned experiments, analysed experimental data, and drafted the manuscript. **I.A. Kornakov** carried out cultivation experiments. **M.P. Korobkina** performed high-performance liquid chromatography. **V.I. Shmurak** performed liquid chromatography-mass spectrometry. **R.V. Drai** set the main research direction and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study was supported by GERO-PHARM. The authors are grateful to their colleagues from the Laboratory for genetic engineering and fermentation who helped them with this study.

Об авторах / Authors

Буслаева Евгения Александровна / **Eugenia A. Buslaeva**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4389-8605>

Хасаншина Зухра Рамилевна / **Zukhra R. Khasanshina**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>

Корнаков Игорь Александрович / **Igor A. Kornakov**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0207-5244>

Коробкина Мария Павловна / **Mariya P. Korobkina**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-9807-7783>

Шмурак Владимир Игоревич / **Vladimir I. Shmurak**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0282-9843>

Драй Роман Васильевич, канд. мед. наук / **Roman V. Drai**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>

Поступила 13.05.2025

После доработки 23.07.2025

Принята к публикации 12.09.2025

Received 13 May 2025

Revised 23 July 2025

Accepted 12 September 2025



Валидация методики на основе биослойной интерферометрии для определения связывающих (общих) антител к ромиплостиму в сыворотке крови человека

А.А. Агафонова¹, М.В. Жияева², И.В. Лягоскин¹, А.А. Казаров¹, А.Е. Лисова¹,
Р.Р. Шукуров¹

¹ Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский,
Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

² Общество с ограниченной ответственностью «ГЕНОТЕРА», ул. Маршала Рыбалко, д. 2,
корпус 6, вн. тер. г. муниципальный округ Щукино, Москва, 123060, Российская Федерация

✉ Агафонова Алена Алексеевна; aaagafonova@generium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В ряде случаев лечение ромиплостимом пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой сопряжено с образованием антилекарственных антител (АЛА), что часто приводит к развитию серьезных неблагоприятных явлений. Для определения связывающих (общих) АЛА (оАЛА) к ромиплостиму в сыворотке крови человека предлагается методика, основанная на биослойной интерферометрии. С технической точки зрения использующие данный принцип приборы имеют некоторые преимущества (высокая пропускная способность, увеличенные межсервисные интервалы, низкий уровень контаминации оборудования при анализе биообразцов) перед приборами на основе поверхностного плазмонного резонанса, которые применяются для мониторинга оАЛА при проведении клинических исследований оригинального препарата. Для обеспечения воспроизводимости измерений и стандартизации лабораторного этапа клинических исследований иммуногенности биоаналогичного препарата необходима валидация методики.

ЦЕЛЬ. Установить ключевые валидационные характеристики методики, основанной на биослойной интерферометрии, для определения общих антилекарственных антител к ромиплостиму в сыворотке крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Принцип метода заключается в детектировании специфического взаимодействия связывающих антител, содержащихся в исследуемых образцах, с иммобилизованным на поверхности стрептавидиновых биосенсоров биотинилированным ромиплостимом. Методика состоит из этапа скрининг-теста, в котором определяется наличие или отсутствие оАЛА в образцах; подтверждающего теста для проверки специфичности связывания оАЛА с ромиплостимом; этапа определения титра антител, то есть предельного разведения, при котором оАЛА могут быть обнаружены в образцах. В работе использовались положительные контрольные образцы, содержащие различные концентрации поликлональных кроличьих антител к ромиплостиму. Детектирование белкового комплексообразования проводилось в режиме реального времени с использованием интерферометра Octet® QKe.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Значения фактора биологической вариабельности и предельного значения незначимого ингибирования составили 1,481 и 34,2% соответственно. Подтверждены прецизионность и специфичность методики. Нижний предел детекции оАЛА в отсутствие ромиплостима составил 622 нг/мл. При оценке эффекта матрицы в скрининг-тесте аналитический сигнал 8 из 10 образцов сыворотки крови после добавления оАЛА увеличился более чем в 1,481 раза; в подтверждающем тесте значение показателя «процент ингибирования» превышало 34,2% при анализе 8 из 10 образцов с добавлением оАЛА. Эффект высокой дозы оАЛА в концентрации от 0,8 до 50 мкг/мл отсутствовал.

Результаты определения оАЛА в скрининг-тесте были устойчивы к присутствию 1 нг/мл ромиплостима в образцах. Стрептавидиновые биосенсоры с иммобилизованным ромиплостимом сохраняли стабильность после 14 сут хранения при температуре 5 ± 3 °C и не менее 20 циклов регенерации.

ВЫВОДЫ. Анализ полученных результатов валидации подтвердил пригодность методики на основе биослойной интерферометрии для достоверного и воспроизводимого определения связывающих (общих) антител к ромиплостиму в сыворотке крови человека.

Ключевые слова: биослойная интерферометрия; связывающие антитела к ромиплостиму; валидация аналитической методики; клиническая разработка; биоаналогичный лекарственный препарат

Для цитирования: Агафонова А.А., Жилыева М.В., Лягоскин И.В., Казаров А.А., Лисова А.Е., Шукуров Р.Р. Валидация методики на основе биослойной интерферометрии для определения связывающих (общих) антител к ромиплостиму в сыворотке крови человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):271–283. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639>

Финансирование. Работа выполнена за счет финансовой поддержки АО «ГЕНЕРИУМ».

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Validation of a biolayer interferometry-based method for the determination of binding (total) antibodies to romiplostim in human serum

Alena A. Agafonova¹✉, Maria V. Zhilyaeva², Ivan V. Lyagoskin¹, Alexander A. Kazarov¹, Alena E. Lisova¹, Rakhim R. Shukurov¹

¹ GENERIUM JSC, 14 Vladimirskaia St., Volginsky, Petushinsky District, Vladimir region 601125, Russian Federation

² GENOTERA LLC, 2/6 Marshal Rybalko St., Municipal District Shchukino, Moscow 123060, Russian Federation

✉ Alena A. Agafonova; aaagafonova@generium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Romiplostim treatment of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura is associated with formation of anti-drug antibodies (ADA), which often leads to the serious adverse events. A method based on biolayer interferometry is proposed for determination of binding (total) ADA (bADA) to romiplostim in human serum. From a technological point of view, instruments using this principle have some advantages (higher throughput, prolonged service intervals, low level of equipment contamination during analysis of biosamples) over those based on surface plasmon resonance, which are used to monitor bADA levels during clinical trials of the original drug. The method should be validated to ensure reproducibility of measurements and standardise clinical laboratory trials of the immunogenicity of a biosimilar drug.

AIM. To establish the key validation characteristics of a biolayer interferometry-based method for the determination of total anti-drug antibodies to romiplostim in human serum.

MATERIALS AND METHODS. The method is used to detect the specific interaction of binding antibodies with biotinylated romiplostim immobilised on the streptavidin-coated biosensors. The method includes a screening test to determine bADA presence or absence in the samples; a confirmatory test to check the specificity of bADA binding to romiplostim; determination of antibody titer and maximal dilution, that allows to detect bADA in the samples. Positive control samples containing different concentrations of polyclonal rabbit antibodies to romiplostim were used in the work. Detection of protein complex formation was performed in real time mode using an Octet® QKe interferometer.

RESULTS. The biological variability factor and the limit of not significant inhibition were 1.481 and 34.2%, respectively. The precision and specificity of the method were confirmed.

The lower limit of bADA detection in the absence of romiplostim was 622 ng/mL. The analytical signal of 8 out of 10 blood serum samples after the addition of bADA increased by more than 1.481 times when assessing the matrix effect in the screening test; the percentage inhibition value exceeded 34.2% when analysing 8 out of 10 samples with the addition of bADA in the confirmatory test. There was no high-dose effect at bADA concentrations from 0.8 to 50 µg/mL. The results of bADA determination in the screening test were robust to the presence of 1 ng/mL romiplostim in the samples. Streptavidin-coated biosensors with immobilised romiplostim maintained stability after 14 days of storage at a temperature of (5±3) °C and at least 20 regeneration cycles.

CONCLUSIONS. Analysis of the validation results obtained confirms the suitability of the method for reliable and reproducible determination of binding (total) antibodies to romiplostim in human serum.

Keywords: biolayer interferometry; romiplostim binding antibodies; assay validation; clinical development; biosimilar drug

For citation: Agafonova A.A., Zhilyaeva M.V., Lyagoskin I.V., Kazarov A.A., Lisova A.E., Shukurov R.R. Validation of a biolayer interferometry-based method for the determination of binding (total) antibodies to romiplostim in human serum. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):271–283. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639>

Funding. This study was funded by GENERIUM JSC.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) – редкое аутоиммунное заболевание, характеризующееся низким количеством тромбоцитов. Использование препаратов агонистов тромбоцитарного рецептора, в число которых входит ромиплостим, увеличивает продолжительность и улучшает качество жизни пациентов с ИТП [1, 2]. Вывод на фармацевтический рынок препарата ромиплостима российского производства способствует большей доступности терапии нуждающимся в ней пациентам.

Ромиплостим представляет собой гибридный белок, состоящий из Fc-фрагмента человеческого IgG1, C-конец каждой цепи которого ковалентно связан с пептидом, содержащим два фрагмента, которые взаимодействуют с тромбоцитарным рецептором. В клинических исследованиях оригинального препарата ромиплостима выявление общих антилекарственных антител (оАЛА) проводили с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR). Вероятность развития клинически значимого иммунного ответа на данный препарат является низкой [3]. Однако образование АЛА может приводить

к развитию серьезных неблагоприятных явлений [4]. Поэтому при разработке биоаналогичного препарата необходимо изучить его иммуногенность с помощью надежной и устойчивой методики.

Международными регуляторными органами рекомендовано использование многоуровневого подхода к оценке оАЛА¹, который состоит из последовательных этапов: скрининг-теста, подтверждающего теста и оценки титра. Мониторинг изменения титра оАЛА помогает интерпретировать данные фармакокинетики, фармакодинамики и клинических наблюдений [5, 6].

Для обнаружения оАЛА используются различные методы, включая иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), электрохемилюминесцентный иммуноанализ (electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA), SPR и биослойную интерферометрию (bio-layer interferometry, BLI) [7]. По сравнению с ELISA и ECLIA, метод BLI имеет более низкую чувствительность, но потенциально более устойчив к присутствию лекарственного препарата в анализируемых образцах [8] и позволяет обнаруживать низкоаффинные антитела, характерные для раннего иммунного ответа² [7, 9, 10].

¹ Immunogenicity testing of therapeutic protein products – developing and validating assays for anti-drug antibody detection. Guidance for industry. Center for Biologics Evaluation and Research, FDA; 2019.

EMA/CHMP/BMWP/14327/2006 Rev 1. Guideline on immunogenicity assessment of therapeutic proteins. EMA; 2017.

² Immunogenicity assessment of therapeutic protein on the Octet® BLI System. Technical note. Sartorius. <https://www.sartorius.com/resource/blob/1523320/b9e4c06d9543d580afc4b401cfec69ed/immunogenicity-assessment-bli-octet-technical-note-en-sartorius-pdf-260224--data.pdf>

В данной работе впервые в клинических исследованиях ромиплостима предлагается использовать BLI для определения оАЛА. С помощью метода BLI так же, как и SPR, можно детектировать образование белковых комплексов в режиме реального времени. Для измерительных приборов на основе SPR характерна проблема загрязнения сывороткой крови каналов, служащих для доставки образца на поверхность биосенсорного чипа. В BLI используется подход «dip-and-read», при котором биосенсоры погружаются в лунки планшета, содержащие образцы, что исключает описанную выше проблему [7, 9].

Цель работы — установить ключевые валидационные характеристики методики, основанной на биослойной интерферометрии, для определения общих антилекарственных антител к ромиплостиму в сыворотке крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Исследование было одобрено на заседании Межвузовского комитета по этике (Протокол № 2 от 20.02.2020) при АНО «Организационно-техническое обеспечение «МКЭ». Пробы периферической венозной крови забирали в пробирки Vacuette с активатором свертывания крови (кат. № 455059, Greiner Bio-One GmbH, Австрия) от здоровых добровольцев мужского пола в возрасте от 18 до 50 лет, не получавших лечение ромиплостимом. Для выделения сыворотки крови пробирки оставляли на 20–30 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали при 1800 g и 4 °C в течение 10 мин. Образцы сыворотки крови алиquotировали и хранили при температуре минус 80 °C до проведения анализа.

В качестве негативного контрольного образца (negative control, NC), заведомо не содержащего антилекарственных антител, использовали пулированную сыворотку крови человека «Normal human serum» (кат. № S1-100 ML, Merck Millipore, США).

Для приготовления положительных контрольных образцов (positive control, PC) в NC добавляли поликлональные кроличьи антитела, специфичные к ромиплостиму (получены в АО «ГЕНЕРИУМ»), до финальной концентрации 50 мкг/мл (очень высокий положительный контроль, VNPC), 10 мкг/мл (высокий положительный контроль, NPC), 2 мкг/мл (средний положительный контроль, MPC) и 0,8 мкг/мл (низкий положительный контроль, LPC).

Для приготовления контрольных образцов, содержащих неспецифические антитела, в NC добавляли моноклональные человеческие

антитела к омализумабу (кат. № HCA235, Bio-Rad, США) до финальной концентрации 10 мкг/мл или человеческие антитела класса G (кат. № ab98981, Abcam, Великобритания) — до 20 мкг/мл.

Для конъюгирования ромиплостима с биотином использовали биоаналогичный препарат Стимплейт (серия MW00120, АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) или оригинальный препарат Энплейт (серия 1100215A, Amgen Europe B.V., Нидерланды) и набор для биотинилирования «Biotin (Type A) Fast Conjugation Kit» (кат. № ab201795, Abcam, Великобритания).

Для оценки специфичности подтверждающего теста использовали лекарственный препарат Луцентис® (серия SH275, Novartis Pharma Stein AG, Швейцария), содержащий ранибизумаб в качестве действующего вещества.

Для приготовления буферных растворов использовали следующие реактивы: фосфатно-солевой буфер, pH 7,4, таблетки (кат. № B-60201, НПЦ «Эко-Сервис», Россия); Твин 20 (кат. № P7949, Sigma-Aldrich, США); натрия азид (кат. № A1430.0100, Panreac Applichem, Испания); глицин (кат. № 1.00590.1000, Merck, Германия). В работе использовали буферный раствор PBS-T (10 mM фосфатно-солевой буферный раствор; 0,05% Твин 20, pH 7,2–7,6); 5% раствор NC для блокирования биосенсоров (PBS-T; 0,05% натрия азид; 5% NC); буферный раствор для разведения образцов и хранения биосенсоров (PBS-T; 0,05% натрия азид); буферный раствор для регенерации биосенсоров (20 mM глицин-HCl, pH 2,0).

При валидации методики использовали 96-луночные несорбирующие планшеты черного цвета (кат. № 655209, Greiner Bio-One GmbH, Австрия); стрептавидиновые биосенсоры для интерферометра Octet «High Precision Streptavidin (SAX)» (кат. № 18-5117, Fortebio, США).

Метод биослойной интерферометрии

Подготовка биосенсоров. Биотинилированный ромиплостим в концентрации 10 мкг/мл сорбировали на стрептавидиновых биосенсорах при комнатной температуре в течение 2 ч. Свободные сайты связывания биосенсоров блокировали 5% NC и далее проводили 3 цикла регенерации биосенсоров раствором 20 mM глицин-HCl.

Пробоподготовка образцов. Искажающее воздействие компонентов сыворотки крови, отличающихся от оАЛА (например, ревматоидный фактор и растворимые мишени лекарственных препаратов), которое способно приводить к получению ложных результатов, называется «эффект матрицы». Для снижения этого эффекта

исследуемые и контрольные образцы в 20-кратных разведениях (минимальное необходимое разведение, МНР), приготовленных в PBS-T с добавлением 0,05% натрия азида, инкубировали при 65 °C в течение 20 мин, что, как было установлено в предварительных экспериментах, не влияло на чувствительность метода.

Для определения титра оАЛА из образцов в МНР готовили серии последовательных разведений в 5% NC.

Выполнение скрининг-теста. В лунки 96-луночного несорбирующего планшета черного цвета вносили 240 мкл образцов в МНР после пробоподготовки не менее чем в двух повторях.

Выполнение подтверждающего теста. В лунки планшета вносили 240 мкл образцов в МНР после пробоподготовки не менее чем в четырех повторях. В половину лунок, содержащих каждый анализируемый образец, добавляли ромиплостим до концентрации 20 мкг/мл.

Оценка титра оАЛА. Образцы в объеме 240 мкл (серии последовательных разведений) добавляли в лунки планшета не менее чем в двух повторях.

Детектирование белкового комплексобразования. Образование комплексов ромиплостима и антител к нему регистрировали в режиме реального времени с использованием интерферометра Octet® QKe (Pall Corporation, ForteBio, США). Рабочую температуру поддерживали на уровне 30 °C при скорости перемешивания планшета 1000 rpm. Аналитический сигнал каждого образца представлял собой сдвиг длины волны, измеренный в нм, в конце этапа ассоциации оАЛА с биотинилированным ромиплостимом в течение 17 мин. После каждого этапа ассоциации проводили два цикла регенерации биосенсоров 20 mM глицин-HCl в течение 5 с каждый и последующее уравнивание в 5% NC в течение 50 с.

Статистическая обработка результатов

Основные валидационные характеристики методики определяли в соответствии с рекомендациями G. Shankar с соавт. [5] и D. Jani с соавт. [11].

Оценка нормальности распределения данных в выборках при определении фактора биологической вариабельности ($CPf_{скр}$) и предельного значения незначимого ингибирования ($CP_{пт}$) осуществлялась с использованием статистического теста Д'Агостино – Пирсона в программе GraphPad Prism 8. Остальные расчеты проводились в программе Microsoft Excel 2016.

Обнаружение выбросов в исследуемых данных проводилось с помощью межквартильного

интервала. Коэффициент вариации (%CV) рассчитывался как отношение стандартного отклонения (SD) к среднему значению рассматриваемой величины и выражался в процентах.

Расчет валидационных параметров

Фактор биологической вариабельности для расчета предельного значения скрининг-теста ($CPf_{скр}$) и определения титра оАЛА вычисляли по формуле (1):

$$CPf_{скр} = \frac{10^{95th\ percentile(\log A)}}{A_{mean}}, \quad (1)$$

где 95th percentile ($\log A$) – 95%-й перцентиль десятичного логарифма аналитического сигнала индивидуальных образцов исследуемой выборки; A_{mean} – среднее значение аналитического сигнала индивидуальных образцов исследуемой выборки.

Предельное значение скрининг-теста ($CP_{скр}$) рассчитывали по формуле (2):

$$CP_{скр} = \bar{A}_{NC} \times CPf_{скр}, \quad (2)$$

где $\bar{A}_{NC}$ – среднее значение аналитического сигнала негативного контрольного образца; $CPf_{скр}$ – фактор биологической вариабельности для скрининг-теста и определения титра.

Образцы, значения аналитических сигналов которых превышали предельное значение скрининг-теста, считали условно положительными.

При проведении подтверждающего теста рассчитывали показатель «процент ингибирования» (%) сигнала каждого образца в МНР с добавлением ромиплостима относительно образца в МНР без добавления ромиплостима по формуле (3):

$$\%I = 100 \times \left(1 - \frac{\bar{A}_{CS}}{\bar{A}_B} \right), \quad (3)$$

где $\bar{A}_{CS}$ – среднее значение аналитического сигнала образца с добавлением ромиплостима; $\bar{A}_B$ – среднее значение аналитического сигнала образца без добавления ромиплостима.

Предельное значение незначимого ингибирования ($CP_{пт}$) рассчитывали по формуле (4):

$$CP_{пт} = \%I + 3,09 \times SD_{\%I}, \quad (4)$$

где $\%I$ – среднее значение показателя «процент ингибирования» индивидуальных образцов исследуемой выборки; «3,09» – 0,999 квантиль стандартного нормального распределения; $SD_{\%I}$ – стандартное отклонение показателя «процент ингибирования» образцов исследуемой выборки.

Для снижения вероятности получения ложноположительных результатов взамен рекомендуемого 0,99 квантиля [11] в расчетах использовали 0,999 квантиль стандартного нормального распределения.

Образцы, значение показателя %I которых превышало $CP_{пт}$, считали положительными по наличию оАЛА.

Разведение, при котором аналитический сигнал образца соответствует значению $CP_{скр}$, принимали в качестве титра оАЛА в положительных контрольных образцах.

Оценка прецизионности методики для определения антител к ромиплостиму включала в себя доказательство воспроизводимости и повторяемости результатов.

Прецизионность результатов скрининг-теста оценивали по нормированным коэффициентам (K). Для оценки воспроизводимости нормированные коэффициенты ($K_{воспр}$) рассчитывали по формуле (5):

$$K_{воспр} = \frac{\bar{A}_{PC}}{CP_{скр}}, \quad (5)$$

где $\bar{A}_{PC}$ — среднее значение аналитического сигнала положительного контрольного образца (PC) в опыте; $CP_{скр}$ — предельное значение скрининг-теста.

Аналогичным образом рассчитывали нормированные коэффициенты для оценки повторяемости, но используя значение аналитического сигнала PC отдельного повтора вместо среднего значения сигнала.

Для оценки воспроизводимости и повторяемости подтверждающего теста рассчитывали значения показателя %I по формуле (3), используя средние значения аналитических сигналов и значения аналитических сигналов в отдельных повторах соответственно.

Воспроизводимость результатов определения титра оАЛА оценивали, рассчитывая медиану полученных значений титра оАЛА каждого PC. Максимальное и минимальное допустимые значения титра определяли путем умножения и деления медианного значения на 2,5 (максимальный коэффициент кратности серии разведений для расчета титра).

Нижний предел детекции (НПД) опыта вычисляли по формуле (6):

$$НПД_{опыт} = \frac{C}{\text{Титр}} \times 20, \quad (6)$$

где C — концентрация оАЛА в PC, нг/мл; Титр — рассчитанный в опыте титр оАЛА в PC; «20» — минимальное необходимое разведение.

НПД методики рассчитывали как сумму среднего значения НПД по всем опытам и значения трех стандартных отклонений.

Устойчивость методики к присутствию в образцах лекарственного препарата характеризовали по коэффициенту выявления (%R), который рассчитывали по формуле (7):

$$\%R = 100 \times \frac{\bar{A}_{с\ внесением}}{\bar{A}_{без\ внесения}}, \quad (7)$$

где $\bar{A}_{с\ внесением}$ — среднее значение аналитического сигнала контрольного образца с внесением препарата; $\bar{A}_{без\ внесения}$ — среднее значение аналитического сигнала контрольного образца без внесения препарата.

Стабильность биосенсоров с иммобилизованным ромиплостимом для каждого исследуемого PC оценивали по значениям %R, которые рассчитывали по отношению значений аналитических сигналов, полученных при использовании биосенсоров после хранения и до закладки на хранение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перечень оцененных валидационных характеристик и критерии приемлемости представлены с учетом текущих требований нормативной документации³.

Определение фактора биологической вариабельности для расчета предельного значения скрининг-теста и определения титра оАЛА

Для определения фактора биологической вариабельности ($CPf_{скр}$) были проанализированы 48 образцов сыворотки крови человека. Образцы анализировали два исследователя, каждый из которых провел три независимых опыта в разные дни. Один опыт включал в себя скрининг-тест всех исследуемых образцов.

Результаты статистического теста Д'Агостино–Пирсона показали, что распределение значений аналитического сигнала образцов исследуемой выборки не соответствует нормальному. Значения аналитических сигналов были преобразованы в соответствующие значения десятичного логарифма, при этом два образца были исключены из расчета $CPf_{скр}$ как выбросы. Среднее значение $CPf_{скр}$ составило 1,481.

³ Immunogenicity testing of therapeutic protein products — developing and validating assays for anti-drug antibody detection. Guidance for industry. Center for Biologics Evaluation and Research, FDA; 2019.
ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.

Определение предельного значения незначимого ингибирования для подтверждающего теста

Вычисленное значение незначимого ингибирования аналитического сигнала, выраженное в процентах, разделяющее исследуемые образцы на подтвержденные или неподтвержденные по наличию оАЛА, называют предельным значением незначимого ингибирования для подтверждающего теста ($CP_{\text{пт}}$) [12].

Оценка $CP_{\text{пт}}$ проводилась на той же выборке и при тех же условиях, что и оценка $CP_{\text{скр}}$. Значения показателя %I аналитического сигнала образцов исследуемой выборки характеризовались нормальным распределением; выбросы не были выявлены. Значение $CP_{\text{пт}}$ подтверждающего теста составило 34,2%.

Оценка прецизионности результатов методики

Для оценки воспроизводимости методики были проанализированы образцы РС и НС двумя исследователями в разные дни (табл. S1, опубликована на сайте журнала⁴). Для оценки повторяемости каждый контрольный образец был проанализирован в 6 повторах одним исследователем в одном опыте (табл. S2, опубликована на сайте журнала⁵).

При оценке результатов руководствовались следующими критериями приемлемости:

- коэффициент вариации между значениями нормированного коэффициента (K) при про-

ведении скрининг-теста или между значениями показателя %I при проведении подтверждающего теста должен составлять $\leq 20\%$ при оценке повторяемости и $\leq 25\%$ при оценке воспроизводимости;

- значения титра оАЛА не должны отклоняться от рассчитанного медианного значения более чем в 2,5 раза.

На рисунке 1 приведен пример сенсограммы, полученной при определении титра оАЛА в образце VНРС.

При оценке воспроизводимости и повторяемости коэффициент вариации значений показателя K не превышал 6,7 и 10,5%, а показателя %I – 3,0 и 7,8% соответственно. Полученные значения титра оАЛА при оценке воспроизводимости отличались от медианного значения не более чем в 2,1 раза (табл. S1, табл. S2).

Результаты оценки прецизионности удовлетворяли установленным критериям приемлемости.

Оценка нижнего предела детекции скрининг-теста

Значение НПД оАЛА к ромиплостиму определяли по данным 6 независимых опытов, выполненных двумя исследователями в разные дни. Образцы НРС анализировали в серии разведений от 1/20 до 1/2000. Несмотря на то, что поликлональные кроличьи антитела

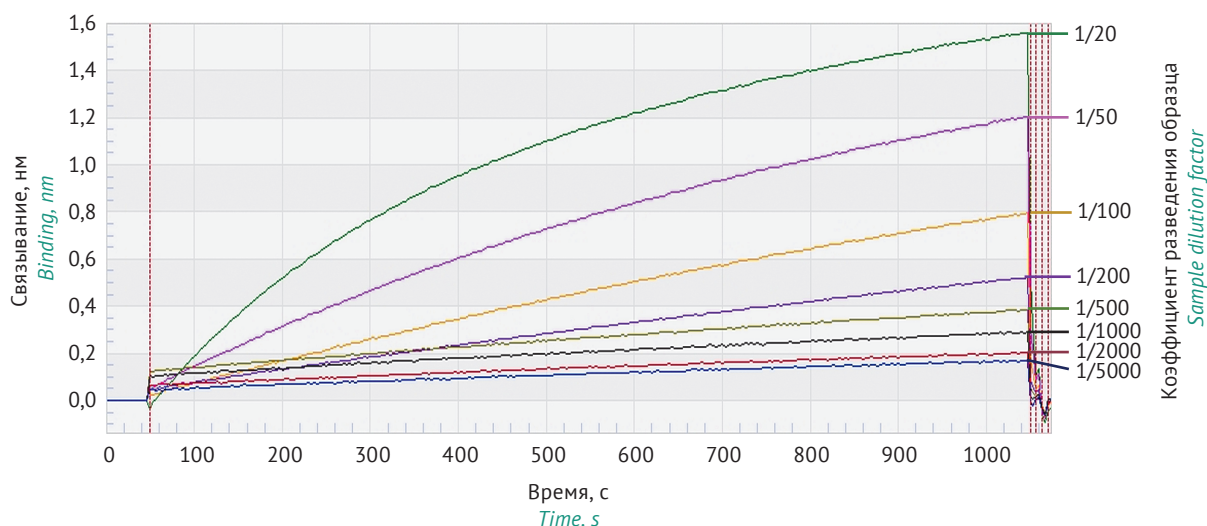


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Типовая сенсограмма взаимодействия поликлональных кроличьих антител к ромиплостиму в разных разведениях исходного образца (50 мкг/мл) с иммобилизованным на стрептавидиновых биосенсорах ромиплостимом.

Fig. 1. A typical biosensorgram of the interaction of polyclonal rabbit antibodies to romiplostim in different dilutions of the initial sample (50 µg/mL), with romiplostim immobilised on the streptavidin-coated biosensors.

⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s1>

⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s2>

не могут полностью отражать свойства человеческих антител, образующихся в ответ на введение ромиплостима, их использование на этапе разработки позволило оптимизировать условия анализа, повысив его чувствительность [13, 14]. Значение НПД методики по обнаружению поликлональных кроличьих антител к ромиплостиму составило 622 нг/мл.

Оценка эффекта высокой дозы при проведении скрининг-теста и подтверждающего теста

Эффект высокой дозы — распространенное явление, при котором из-за ограниченного количества иммобилизованного препарата и чрезвычайно высоких концентраций антител в образце происходит снижение образования комплексов антиген/антитело. Эффект высокой дозы способен приводить к получению ложноотрицательных результатов [15].

Для определения эффекта высокой дозы в скрининг-тесте и подтверждающем тесте использовали образцы VHPC и HPC. Предельное значение скрининг-теста в проведенном опыте составило 0,1552. Более высокой концентрации антител соответствовал более высокий

уровень аналитического сигнала в скрининг-тесте и большее значение показателя %I (табл. S3, опубликована на сайте журнала⁶). Эффект высокой дозы при анализе образцов VHPC и HPC отсутствовал.

Вероятность возникновения эффекта высокой дозы крайне мала при анализе образцов, содержащих нативные человеческие антитела к ромиплостиму, которые характеризуются более низкой аффинностью по сравнению с антителами, используемыми в положительных контрольных образцах [13]. Для снижения вероятности получения ложноотрицательных результатов использовали дополнительные разведения образцов, аналитический сигнал которых соответствовал VHPC, при этом сохранялось 5%-ное содержание сыворотки в разведениях образцов.

Эффект матрицы при проведении скрининг-теста и подтверждающего теста

Для оценки эффекта матрицы в индивидуальные образцы сыворотки крови здоровых добровольцев, не получавших ранее лечение ромиплостимом, добавляли поликлональные кроличьи антитела к ромиплостиму до финальной концентрации 800 нг/мл. В качестве

Таблица 1. Оценка эффекта матрицы при проведении скрининг-теста

Table 1. Assessment of the matrix effect during the screening test

Номер образца Sample ID	Без добавления оАЛА Without the addition of binding ADA			С добавлением оАЛА With the addition of binding ADA			
	$\bar{A}_{\text{ио}}, \text{нм}$ $\bar{A}_{\text{ио}}, \text{nm}$	%CV	$\bar{A}_{\text{ио}} \leq \text{CP}_{\text{скр}}$	$\bar{A}_{\text{ЛРС}}, \text{нм}$ $\bar{A}_{\text{ЛРС}}, \text{nm}$	%CV	$\frac{\bar{A}_{\text{ЛРС}}}{\bar{A}_{\text{ио}}}$	$\frac{\bar{A}_{\text{ЛРС}}}{\bar{A}_{\text{ио}}} > \text{CPf}_{\text{скр}}$
IS06	0,1463	0,4	Да / Yes	0,2067	0,4	1,413	Нет / No
IS11	0,0933	3,5	Да / Yes	0,1493	0,9	1,600	Да / Yes
IS17	0,0777	2,0	Да / Yes	0,1326	7,6	1,706	Да / Yes
IS28	0,0605	0,2	Да / Yes	0,1251	0,6	2,067	Да / Yes
IS29	0,0877	4,3	Да / Yes	0,1443	0,3	1,646	Да / Yes
IS31	0,1826	0,6	Нет / No	0,2232	0,3	1,222	Нет / No
IS37	0,0681	6,3	Да / Yes	0,1398	2,4	2,054	Да / Yes
IS44	0,0529	0,4	Да / Yes	0,1167	1,0	2,208	Да / Yes
IS47	0,0954	13,7	Да / Yes	0,1719	1,3	1,803	Да / Yes
IS48	0,1254	4,1	Да / Yes	0,1871	1,2	1,492	Да / Yes

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

Примечание. оАЛА — общее антилекарственное антитело; %CV — коэффициент вариации; $\text{CP}_{\text{скр}}$ — предельное значение скрининг-теста (0,158); $\text{CPf}_{\text{скр}}$ — фактор биологической вариабельности; $\bar{A}_{\text{ио}}$ — усредненное значение сигнала исследуемого образца без добавления оАЛА; $\bar{A}_{\text{ЛРС}}$ — усредненное значение сигнала исследуемого образца с добавлением оАЛА до 800 нг/мл. Note. ADA, anti-drug antibodies; %CV, coefficient of variation; $\text{CP}_{\text{скр}}$, cutoff value of the screening test (0.158); $\text{CPf}_{\text{скр}}$, biological variability factor; $\bar{A}_{\text{ио}}$, mean value of the signal of the test sample without addition of ADA; $\bar{A}_{\text{ЛРС}}$, mean value of the signal of the test sample with addition of ADA up to 800 ng/mL.

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s3>

образцов сравнения служили образцы сыворотки крови без добавления антител.

По данным скрининг-теста, аналитические сигналы 9 из 10 образцов без добавления антител были ниже предельного значения скрининг-теста (0,158); один образец IS31 показал ложноположительный результат (табл. 1). Аналитические сигналы всех образцов, содержащих антитела к ромиплостиму, включая IS31, были охарактеризованы как условно положительные. При этом аналитические сигналы 8 из 10 образцов, содержащих оАЛА, превышали таковые образцов сравнения более чем в 1,481 раза (табл. 1).

Результаты оценки эффекта матрицы при проведении подтверждающего теста приведены в таблице 2. Для 8 из 10 проанализированных образцов значения показателя %I превышали значения $CP_{\text{пт}}$.

Аналитический сигнал образцов IS06 и IS31 после добавления в них антител к ромиплостиму вырос менее чем в 1,481 раза. С одной стороны, в скрининг-тесте было установлено, что аналитические сигналы данных образцов без добавления антител были несколько повышены относительно среднего значения сигнала по выборке (табл. 1). С другой стороны, значения показателя %I образцов IS06 и IS31 были ниже значения $CP_{\text{пт}}$.

(табл. 2). Эти наблюдения могут быть обусловлены неспецифическим связыванием с биосенсором компонентов сыворотки крови, препятствующих связыванию антител. Предположительно, при более высоких (>800 нг/мл) концентрациях антител к ромиплостиму в образцах вероятность получения ложноположительных результатов в подтверждающем тесте будет минимальна.

Оценка специфичности методики при проведении скрининг-теста и подтверждающего теста

При проведении скрининг-теста усредненные значения аналитических сигналов контрольных образцов, содержащих 10 мкг/мл антител к омализумабу или 20 мкг/мл человеческих антител класса G, составили 0,1070 и 0,1029 соответственно и были ниже предельного значения скрининг-теста (0,166). Ложноположительных результатов не наблюдалось.

При проведении подтверждающего теста добавление в образцы ромиплостима в качестве антигена должно приводить к ингибированию сигнала связывания специфических антител, не оказывая влияния на антитела иной специфичности⁷. В таблице S4 (опубликована на сайте журнала⁸) показаны результаты

Таблица 2. Оценка эффекта матрицы при проведении подтверждающего теста образцов сыворотки крови с добавлением оАЛА
Table 2. Assessment of the matrix effect in confirmatory test while analysing blood serum samples with the addition of binding ADA

Номер образца Sample ID	$\bar{A}_B$, нМ $\bar{A}_B$, nm	%CV	$\bar{A}_{CS}$, нМ $\bar{A}_{CS}$, nm	%CV	%I	%I > $CP_{\text{пт}}$
IS04	0,1978	5,2	0,0969	9,7	51,0	Да / Yes
IS05	0,2545	7,3	0,1317	10,8	48,3	Да / Yes
IS06	0,2067	0,4	0,1425	4,1	31,1	Нет / No
IS11	0,1493	0,9	0,0800	0,4	46,4	Да / Yes
IS17	0,1326	7,6	0,0708	0,1	46,6	Да / Yes
IS28	0,1251	0,6	0,0596	4,6	52,4	Да / Yes
IS29	0,1443	0,3	0,0774	1,6	46,4	Да / Yes
IS31	0,2232	0,3	0,1581	8,3	29,2	Нет / No
IS37	0,1398	2,4	0,0801	5,1	42,7	Да / Yes
IS44	0,1167	1,0	0,0643	13,1	44,9	Да / Yes

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

Примечание. оАЛА — общее антилекарственное антитело; $\bar{A}_B$ — среднее значение аналитического сигнала индивидуального образца сыворотки крови без добавления ромиплостима; $\bar{A}_{CS}$ — среднее значение аналитического сигнала индивидуального образца сыворотки крови с добавлением ромиплостима; %CV — коэффициент вариации; %I — показатель «процент ингибирования» сигнала образца с добавлением ромиплостима; $CP_{\text{пт}}$ — предельное значение незначимого ингибирования.
Note. ADA, anti-drug antibodies; $\bar{A}_B$, mean value of the analytical signal of an individual blood serum sample without addition of romiplostim; $\bar{A}_{CS}$, mean value of the analytical signal of an individual blood serum sample with addition of romiplostim; %CV, coefficient of variation; %I, percentage of signal inhibition of a sample with addition of romiplostim; $CP_{\text{пт}}$, cutoff value of not significant inhibition.

⁷ Immunogenicity testing of therapeutic protein products — developing and validating assays for anti-drug antibody detection. Guidance for industry. Center for Biologics Evaluation and Research. FDA; 2019.

⁸ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s4>

анализа контрольных образцов, содержащих разные концентрации антител к ромиплостиму, а также ромиплостим или ранибизумаб. В качестве сравнения анализировали образцы, не содержавшие антигенов.

В отличие от ромиплостима, добавление ранибизумаба в качестве неспецифического антигена значимо не ингибировало связывание антител с ромиплостимом. Таким образом, неспецифическое ингибирование аналитического сигнала при проведении подтверждающего теста отсутствовало.

Оценка устойчивости методики к присутствию в образцах лекарственного препарата и его мишени

Мишенью ромиплостима является рецептор тромбопоэтина — трансмембранного белка, расположенного на поверхности тромбоцитов и мегакариоцитов [16]. За исключением случаев контаминации образцов клетками крови при неадекватной пробоподготовке, присутствие рецептора тромбопоэтина в образцах сыворотки крови не предполагается. Следовательно, вероятность возникновения ложноположительных результатов крайне низкая и оценивать влияние белка-мишени на результаты анализа не требуется.

Лекарственный препарат в свободной форме или в форме иммунных комплексов с оАЛА может присутствовать в исследуемых образцах. Поэтому важно оценить устойчивость методики определения оАЛА к ромиплостиму к присутствию последнего, для чего анализировали контрольные образцы, содержавшие 0,8, 2, 10 мкг/мл специфических антител и 1 нг/мл ромиплостима (табл. S5, опубликована на сайте журнала⁹).

По данным J. Qi с соавт. [17], при ежедневном введении ромиплостима в течение 2 нед. максимальная концентрация препарата в сыворотке крови пациентов с ИТП составила 52 и 105 пг/мл при применении препарата в дозе 1 мкг/кг и 3 мкг/кг ромиплостима соответственно [17]. Следовательно, концентрация 1 нг/мл в целом превышает предполагаемый диапазон концентраций ромиплостима в образцах сыворотки крови пациентов, получающих лечение ромиплостимом, и соответствует требованиям к устойчивости методики определения оАЛА в присутствии лекарственного препарата в образцах¹⁰.

Исследования показали, что при анализе образцов, содержащих 1 нг/мл ромиплостима, снижение регистрируемого сигнала отсутствовало.

Оценка устойчивости результатов скрининг-теста и подтверждающего теста к замене компонентов аналитической системы

Для оценки устойчивости результатов скрининг-теста и подтверждающего теста к замене компонентов аналитической системы образцы РС анализировали с использованием биосенсоров, сорбированных биотинилированным ромиплостимом, приготовленным из оригинального или биоаналогичного препарата. В подтверждающем тесте в исследуемые образцы добавляли оригинальный препарат ромиплостима в качестве специфического антигена. Результаты данного анализа сравнивали с результатами анализа образцов, содержащих биоаналогичный препарат.

Экспериментально подтверждена сопоставимость уровней аналитического сигнала независимо от вида используемого препарата, что свидетельствует о возможности применения методики для оценки клинических образцов, содержащих оАЛА, выработанные в ответ на введение как оригинального, так и биоаналогичного препаратов (табл. S6, опубликована на сайте журнала¹¹).

Оценка стабильности иммобилизованного на биосенсорах ромиплостима после хранения и регенераций

Стабильность биосенсоров с иммобилизованным биотинилированным ромиплостимом после длительного хранения и регенерации оценивали путем определения оАЛА в образцах с использованием биосенсоров, которые хранили в течение 2 нед. при температуре 5 ± 3 °C и подвергали не менее 20 циклам регенерации. Результаты оценки стабильности приведены в таблице 3.

В качестве критерия приемлемости использовался диапазон значений коэффициента выявления %R — от 80 до 120%. Согласно полученным данным, иммобилизованный на биосенсорах биотинилированный ромиплостим был стабилен после хранения в течение 2 нед. при температуре 5 ± 3 °C и не менее 20 циклов регенерации.

⁹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s5>

¹⁰ Immunogenicity testing of therapeutic protein products — developing and validating assays for anti-drug antibody detection. Guidance for industry. Center for Biologics Evaluation and Research, FDA; 2019.

¹¹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s6>

Таблица 3. Оценка стабильности иммобилизованного на биосенсорах ромиплостима после хранения и регенераций
Table 3. Stability assessment of romiplostim immobilised on the biosensors after storage and regenerations

Образец <i>Sample</i>	A1, нм <i>A1, nm</i>	A2, нм <i>A2, nm</i>	$\bar{A}$, нм <i>$\bar{A}$, nm</i>	SD	%CV	%R
Биосенсоры до хранения / <i>Biosensors before storage</i>						
HPC	0,8098	0,7033	0,757	0,0753	10,0	–
MPC	0,2662	0,2623	0,264	0,0028	1,0	–
LPC	0,1655	0,1861	0,176	0,0146	8,3	–
Биосенсоры после хранения ^a / <i>Biosensors after storage^a</i>						
HPC	0,6379	0,6610	0,6495	0,0163	2,5	86
MPC	0,2683	0,2674	0,2679	0,0006	0,2	101
LPC	0,1742	0,1777	0,1760	0,0025	1,4	100

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

Примечание. A1 и A2 – значения аналитического сигнала в двух повторах; $\bar{A}$ – среднее значение сигнала образца; SD – стандартное отклонение; %CV – коэффициент вариации; %R – коэффициент выявления; HPC, MPC, LPC – высокий, средний и низкий положительный контрольный образец соответственно; «–» – не применимо.

^a Биосенсоры после хранения в течение 2 нед. при 5±3 °С и не менее 20 циклов регенераций.

Note. A1 and A2, analytical signal values of two replicates; $\bar{A}$, mean value of the analytical signal; SD, standard deviation; %CV, coefficient of variation; %R, detection coefficient; HPC, MPC, and LPC, high, medium and low positive control sample, respectively; –, not applicable.

^a Biosensors after storage for 2 weeks at 5±3 °C and at least 20 regeneration cycles.

ВЫВОДЫ

1. Результаты проведенной валидации подтверждают пригодность разработанной методики для получения достоверных и воспроизводимых результатов при определении оАЛА к ромиплостиму в образцах сыворотки крови человека.

2. Доказана применимость методики для оценки связывающих антител к ромиплостиму в образцах сыворотки крови человека, образующихся в ответ на введение как оригинального, так и биоаналогичного препаратов.

3. Метод биослойной интерферометрии может применяться для определения оАЛА, в том
- случае, если компоненты сыворотки крови оказывают значительное влияние на результаты анализа.

4. Преимущество разработанной методики заключается в возможности определения оАЛА в образцах, содержащих 1 нг/мл ромиплостима.

5. Анализ 96-луночного планшета занимает 4 ч, включая этап пробоподготовки образцов.

6. Регенерация биосенсоров позволяет выполнить не менее 20 независимых измерений связывания оАЛА с ромиплостимом без потери качества данных.

Литература/References

1. Меликян АЛ, Егорова ЕК, Пустовая ЕИ, Колошейнова ТИ, Володичева ЕМ, Капорская ТС и др. Промежуточные результаты эпидемиологического исследования идиопатической тромбоцитопенической пурпуры у взрослых в Российской Федерации. *Гематология и трансфузиология*. 2019;64(4):436–46. Melikyan AL, Egorova EK, Pustovaya EI, Kolosheynova TI, Volodicheva EM, Kaporskaya TS, et al. Interim results of epidemiological study of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults in the Russian Federation: intermediate results. *Hematology and Transfusiology*. 2019;64(4):436–46 (In Russ.).
<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-4-436-446>

2. Neunert C, Terrell DR, Arnold DM, Buchanan G, Cines DB, Cooper N, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. *Blood Adv*. 2019;3(23):3829–66.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000966>

3. Barger TE, Boshier A, Jawa V, Kim J, Mytych DT, Park J, et al. Assessment of romiplostim immunogenicity in adult patients in clinical trials and in a global registry. *Blood*. 2018;132 (Supplement 1):2427.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-113484>

4. Swanson SJ. What are clinically significant anti-drug antibodies and why is it important to identify them. *Front Immunol*. 2024;15:1401178.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1401178>

5. Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48(5):1267–81.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.020>

6. Hagman C, Chasseigne G, Nelson R, Anlauff F, Kagan M, Goldfine AB, et al. Immunogenicity assessment strategy

- for a chemically modified therapeutic protein in clinical development. *Front Immunol.* 2024;15:1438251 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1438251>
7. Shibata H, Nishimura K, Miyama C, Tada M, Suzuki T, Saito Y, et al. Comparison of different immunoassay methods to detect human anti-drug antibody using the WHO erythropoietin antibody reference panel for analytes. *J Immunol Methods.* 2018;452:73–7. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.09.009>
 8. Li J, Schantz A, Schwegler M, Shankar G. Detection of low-affinity anti-drug antibodies and improved drug tolerance in immunogenicity testing by Octet® biolayer interferometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;54(2):286–94. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.08.022>
 9. Jug A, Bratković T, Ilaš J. Biolayer interferometry and its applications in drug discovery and development. *Trends Anal Chem.* 2024;176:117741. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117741>
 10. Wadhwa M, Knezevic I, Kang H-N, Thorpe R. Immunogenicity assessment of biopharmaceutical products: An overview of assays and their utility. *Biologicals.* 2015;43(5):298–306. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.06.004>
 11. Jani D, Marsden R, Mikulskis A, Gleason C, Klem T, Fiorotti CK, et al. Recommendations for the development and validation of confirmatory anti-drug antibody assays. *Bioanalysis.* 2015;7(13):1619–31. <https://doi.org/10.4155/bio.15.96>
 12. Smith HW, Moxness M, Marsden R. Summary of confirmation cut point discussions. *AAPS J.* 2011;13(2):227–9. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9263-z>
 13. Gunn GR, Sealey DC, Jamali F, Meibohm B, Ghosh S, Shankar G. From the bench to clinical practice: understanding the challenges and uncertainties in immunogenicity testing for biopharmaceuticals. *Clin Exp Immunol.* 2016;184(2):137–46. <https://doi.org/10.1111/cei.12742>
 14. Tada M, Suzuki T, Ishii-Watabe A. Development and characterization of an anti-rituximab monoclonal antibody panel. *MAbs.* 2018;10(3):370–9. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1424610>
 15. Namburi RP, Kancherla V, Ponnala AR. High-dose hook effect. *J Dr NTR Univ Health Sci.* 2014;3(1):5–7. <https://doi.org/10.4103/2277-8632.128412>
 16. Varghese LN, Defour J-P, Pecquet C, Constantinescu SN. The Thrombopoietin receptor: structural basis of traffic and activation by ligand, mutations, agonists, and mutated calreticulin. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:59. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00059>
 17. Qi J, Zheng L, Hu B, Zhou H, He Q, Liu H, et al. Pharmacokinetics, safety, and pharmacodynamics of romiplostim in Chinese subjects with immune thrombocytopenia: a phase I/II trial. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2022;11(3):379–87. <https://doi.org/10.1002/cpdd.1059>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликованы таблицы S1–S6.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s1>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s2>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s3>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s4>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s5>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s6>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Агафонова** — написание текста рукописи, формулирование выводов, работа с источниками литературы; **М.В. Жилыева** — планирование исследования, выполнение экспериментальных работ, интерпретация результатов исследования; **И.В. Лягоскин** — постановка цели, руководство исследованием, работа с текстом и критический пересмотр его содержания; **А.А. Казаров** — статистическая обработка данных на всех этапах валидации методики; **А.Е. Лисова** — доработка текста рукописи; **Р.Р. Шукуров** — критическая оценка содержания текста, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено на заседании Межвузовского комитета по этике (Протокол № 2 от 20.02.2020) при АНО «Организационно-техническое обеспечение «МКЭ».

Благодарности. Авторы выражают благодарность В.М. Симонову за ценные консультации по проводимой работе, а также всему коллективу АО «ГЕНЕРИУМ» за предоставление оборудования, материалов и содействие при проведении исследования.

Additional information. Tables S1–S6 are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.*

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s1>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s2>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s3>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s4>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s5>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s6>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Agafonova** wrote the manuscript, formulated conclusions, and worked with literature sources. **M.V. Zhilyaeva** developed the study plan, performed experimental work, and interpreted the results of the study. **I.V. Lyagoskin** formulated the goal, supervised the study, worked with the text and critically revised its content. **A.A. Kazarov** performed statistical processing of data at all stages of method validation. **A.E. Lisova** finalised the manuscript. **R.R. Shukurov** critically evaluated the content of the text, and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was approved at a meeting of the Interuniversity Ethics Committee (Protocol No. 2 of 20 February 2020) at the ANO Organisational and Technical Support of the IEC.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to V.M. Simonov for valuable consultations on the work carried out, as well as to the entire staff of GENERIUM JSC for providing equipment and materials as well as assistance in conducting the research.

Об авторах / Authors

Агафонова Алена Алексеевна / Alena A. Agafonova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-9163-7991>

Жиляева Мария Владимировна / Maria V. Zhilyaeva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9880-1724>

Лягоскин Иван Владимирович, канд. биол. наук / **Ivan V. Lyagoskin**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9058-1106>

Казаров Александр Александрович / Alexander A. Kazarov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0682-6113>

Лисова Алена Евгеньевна / Alena E. Lisova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-1232-5660>

Шукуров Рахим Рахманкулыевич, канд. биол. наук / **Rakhim R. Shukurov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

Поступила 26.12.2024

После доработки 24.05.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Online first 06.08.2025

Received 26 December 2024

Revised 24 May 2025

Accepted 6 June 2025

Online first 6 August 2025



Определение антилекарственных антител к афлиберцепту методом иммуноферментного анализа: разработка и валидация методики

И.В. Шевченко , А.Е. Лисова, А.А. Агафонова, К.А. Смолова, И.М. Алаева, И.Ю. Жуков, А.А. Казаров, И.В. Лягоскин

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

✉ Шевченко Иван Вячеславович; iv.shevchenko@generium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Афлиберцепт применяется для лечения неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации, приводящей к потере зрения. К числу существенных побочных эффектов афлиберцепта относится его иммуногенность, проявляющаяся в виде выработки антилекарственных антител (АЛА). В рамках оценки иммуногенности препарата актуальной представляется разработка методики определения АЛА к афлиберцепту.

ЦЕЛЬ. Разработка и валидация аналитической методики для иммуноферментного обнаружения и поэтапной характеристики общих антилекарственных антител к афлиберцепту в сыворотке крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Разработку методики проводили с применением метода твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Использовали афлиберцепт (GNR-098, АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) и конъюгат GNR-098 с пероксидазой хрена. Поликлональные антитела к GNR-098 получали путем иммунизации крыс, последующего отбора сыворотки крови и выделения из нее антител при помощи метода аффинной хроматографии. Обнаружение АЛА осуществляли с использованием меченого GNR-098 при постановке мостикового ИФА. Модельные образцы готовили, используя пулированные сыворотки здоровых доноров с добавлением крысиных поликлональных антител. Валидацию методики проводили по следующим параметрам: пределы исключения методик; прецизионность; предел обнаружения; устойчивость к присутствию в образцах растворимой мишени терапевтического белка; специфичность; эффект матрицы; минимальное необходимое разведение; стабильность; устойчивость к замене ключевого компонента; эффект сверхдозы (хук-эффект).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Аналитическая методика включала скрининг-тест для определения возможного наличия АЛА, подтверждающий тест — для установления специфичности обнаруженных АЛА, тест для определения титра АЛА и их принадлежности к классу IgE. Пределы исключения методик для скрининг-теста и для теста определения АЛА класса IgE составили 1,3 и 1,2 соответственно; для подтверждающего теста — 15,2%. Предел обнаружения скрининг-теста составил 185 нг/мл. Продемонстрирована устойчивость методики к присутствию в образцах до 2000 пг/мл растворимой мишени терапевтического белка (hrVEGF₁₆₅). Отсутствие эффекта матрицы установлено в скрининг-тесте и подтверждающем тесте 13 испытуемых образцов, содержащих АЛА в концентрации 280 нг/мл. Эффект сверхдозы не был установлен в скрининг-тесте и подтверждающем тесте образцов, содержащих АЛА в концентрации, пятикратно превышающей высокоположительный образец.

ВЫВОДЫ. Разработана комплексная аналитическая методика для иммуноферментного обнаружения и поэтапной характеристики общих антилекарственных антител к афлиберцепту (препарат GNR-098) в сыворотке крови человека. Пригодность методики к применению подтверждена в ходе валидации. Разработанная аналитическая система позволит провести оценку иммуногенности афлиберцепта.

Ключевые слова: афлиберцепт; биоаналог; антилекарственные антитела; иммуноферментный анализ; ИФА; оценка иммуногенности; разработка методики; валидация; возрастная макулярная дегенерация; VEGF

Для цитирования: Шевченко И.В., Лисова А.Е., Агафонова А.А., Смолова К.А., Алаева И.М., Жуков И.Ю., Казаров А.А., Лягоскин И.В. Определение антилекарственных антител к афлиберцепту методом иммуноферментного анализа: разработка и валидация методики. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):284–295. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-631>

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

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.

Detection of anti-drug antibodies to aflibercept by enzyme-linked immunosorbent assay: Development and validation of the method

Ivan V. Shevchenko ✉, Alena E. Lisova, Alena A. Agafonova, Ksenia A. Smolova, Irina M. Alaeva, Ivan Yu. Zhukov, Aleksandr A. Kazarov, Ivan V. Lyagoskin

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

✉ Ivan V. Shevchenko; iv.shevchenko@generium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Aflibercept is used to treat neovascular age-related macular degeneration, a leading cause of vision loss. Immunogenicity is one of the significant adverse effects that results in the production of anti-drug antibodies (ADAs). The development of a method for detecting ADAs to aflibercept is essential for immunogenicity assessment.

AIM. This study aimed to develop and validate an analytical method for detection and stepwise characterisation of total anti-drug antibodies to aflibercept in human serum utilising the enzyme-linked immunosorbent assay.

MATERIALS AND METHODS. The method was developed using a solid-phase ELISA. Aflibercept (GNR-098, JSC GENERIUM, Russia) and a conjugate of GNR-098 with horseradish peroxidase were employed. Polyclonal antibodies against GNR-098 were obtained by immunising rats, followed by serum collection and antibody purification via affinity chromatography. ADA detection was performed using labelled GNR-098 in a bridging ELISA. Model samples were prepared by spiking pooled sera from healthy donors with rat polyclonal antibodies. Method validation included the following parameters: cut-off points; precision; limit of detection (LOD); drug tolerance; specificity; matrix effect; minimum required dilution; robustness; reagent stability; hook effect.

RESULTS. An analytical method includes a screening assay for the presumptive detection of ADAs; a confirmatory assay to establish ADA specificity and assay for ADA titer determination and IgE isotyping. The cut-off points for the screening assay and IgE-specific assay were 1.3 and 1.2, respectively; for the confirmatory assay, 15.2%. The LOD of the screening assay was 185 ng/mL. The method demonstrated drug tolerance (interference from soluble target, hrVEGF165) at concentrations up to 2,000 pg/mL. No matrix effects were observed in the screening or confirmatory assays across 13 test samples containing ADAs at 280 ng/mL. The absence of a hook effect was confirmed in both assays using samples with ADA concentrations five times higher than the high-positive control.

CONCLUSIONS. An analytical method was developed for the ELISA-based detection and stepwise characterisation of total anti-drug antibodies to aflibercept (GNR-098) in human serum. The method's suitability was confirmed through validation. This analytical procedure will facilitate the immunogenicity assessment of aflibercept.

Keywords: aflibercept; biosimilar; anti-drug antibodies; ELISA; immunogenicity evaluation; method development; validation; age-related macular degeneration; VEGF

For citation: Shevchenko I.V., Lisova A.E., Agafonova A.A., Smolova K.A., Alaeva I.M., Zhukov I.Yu., Kazarov A.A., Lyagoskin I.V. Detection of anti-drug antibodies to aflibercept by enzyme-linked immunosorbent assay: Development and validation of the method. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):284–295. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-631>

Funding. The study was performed without external funding.

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

Афлиберцепт широко применяется для терапии влажной формы возрастной макулярной дегенерации (ВМД) [1–4], которая проявляется избыточным ростом сосудов и приводит к потере зрения. В мире зарегистрировано до 200 млн человек с ВМД, и их численность увеличивается [5]. Согласно данным компании Regeneron Pharmaceuticals, доходы от продаж афлиберцепта в США в 2023 г. составили 5,9 млрд долларов¹.

Афлиберцепт представляет собой рекомбинантный гибридный белок, состоящий из фрагментов рецептора фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) и Fc-домена иммуноглобулина G (IgG) человека [2].

Одним из существенных побочных эффектов афлиберцепта является его потенциальная иммуногенность, проявляющаяся в разработке антилекарственных антител (АЛА) в ответ на введение препарата. В соответствии с требованиями Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA)², Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA)³ и Министерства здравоохранения Российской Федерации⁴ для каждого биологического лекарственного препарата необходима оценка безопасности, в том числе изучение нежелательной иммуногенности [6–9]. Следует отметить, что производитель оригинального препарата афлиберцепта (Эйлеа)

не предоставляет полную информацию о методах обнаружения и характеристики АЛА, в связи с чем производителям биоаналогов требуется разработка и валидация собственных аналитических методик для обеспечения контроля качества и безопасности терапии.

В Российской Федерации выпускается биоаналог афлиберцепта (GNR-098, АО «ГЕНЕРИУМ»), при разработке которого в рамках концепции «качество через дизайн» (Quality by Design, QbD)⁵ были определены ключевые риски и факторы вариабельности, контроль над которыми обеспечивает получение стабильных результатов. Важнейшим аспектом в оценке иммуногенности является индивидуальная реакция пациента, выражающаяся в уникальных характеристиках продуцируемых антител: клональности, количестве, авидности, изотипическом составе и нейтрализующей активности. Эти особенности не позволяют провести точное количественное определение уровня АЛА в образцах путем сравнения с сигналом калиброванного положительного контроля⁶ [10]. Кроме того, сыворотка крови, используемая для анализа, содержит примеси — различные белки⁷, липиды и ионы, — которые могут влиять на точность измерений.

Источником дополнительной вариабельности служат различия между партиями используемых реагентов, особенности оборудования и работа аналитиков. Эти факторы можно контролировать при строгом соответствии принципам надлежащей клинической лабораторной практики

¹ <https://investor.regeneron.com/news-releases/news-release-details/regeneron-reports-fourth-quarter-and-full-year-2023-financial/>

² <https://www.ema.europa.eu/en/immunogenicity-assessment-biotechnology-derived-therapeutic-proteins-scientific-guideline>

³ <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunogenicity-testing-therapeutic-protein-products-developing-and-validating-assays-anti-drug>

⁴ Методические рекомендации «Оценка иммуногенности биотерапевтических препаратов в странах ЕАЭС». ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; 2021.

⁵ <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/research-development/quality-design>

⁶ <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunogenicity-testing-therapeutic-protein-products-developing-and-validating-assays-anti-drug>

⁷ <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/blood/proteins+detected+in+ms>

(Good Clinical Laboratory Practice, GCLP)⁸. Также важно учитывать сочетанное влияние множества факторов на конечный результат, что требует одновременной оптимизации нескольких параметров при разработке методики.

Цель работы – разработка и валидация аналитической методики для иммуноферментного обнаружения и поэтапной характеристики общих антилекарственных антител к афлиберцепту в сыворотке крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Реагенты. В работе использовали афлиберцепт GNR-098 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); афлиберцепт Эйлеа, оригинальный препарат (Байер АГ, Германия); поликлональные крысиные антитела к GNR-098 (АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); нативные человеческие иммуноглобулины (кат. № ab91102, ab91117, ab152001), наборы для биотинилирования (кат. № ab201796) и стрептавидин, меченный пероксидазой хрена (ПХ) (кат. № ab7403, Abcam, Великобритания); наборы для конъюгирования с ПХ (кат. № LNK004P) и антитела к человеческим IgE (кат. № STAR147P, BioRad, США); рекомбинантный фактор роста эндотелия сосудов человека, VEGF (кат. № GF315, Sigma, США; АО «ГЕНЕРИУМ», Россия); субстратный раствор на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (кат. № 01016-1, НПО «Био Тест Системы», Россия). Для приготовления буферных растворов применяли: глицин (Merck, Германия); бычий сывороточный альбумин (BCA) (Sequens, Франция); трис основной (Scharlab, Испания); 0,01 М фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,2–7,6 (НПЦ «Эко-Сервис», Россия); серная кислота, хч (ООО «МиниМед», Россия); натрия карбонат, натрия бикарбонат BioXtra (Sigma-Aldrich, США).

Модельные образцы. Готовили модельные образцы (МО), которые имитировали образцы сыворотки крови от пациентов. Для учета влияния индивидуальной вариабельности пациентов в качестве негативного МО (НМО) использовали пулированную сыворотку крови, полученную от 50 здоровых доноров (материал предоставлен ГБУЗ ВО «Областная станция переливания крови», г. Владимир). Положительные МО (ПМО) готовили путем внесения в НМО антилекарственных антител – поликлональных крысиных антител к GNR-098 в концентрациях 20, 5 и 0,5 мкг/мл для получения высокоположительного (ВПО), среднеположительного (СПО)

и низкоположительного (НПО) модельных образцов соответственно.

Буферные растворы для разведения и блокирования. Для разведения испытуемых образцов (МО и сыворотки крови здоровых доноров), а также для блокирования свободных участков связывания в лунках полистироловых планшетов использовали растворы, приготовленные в ФСБ. Эффективность буферных растворов оценивали по их способности снижать фоновую оптическую плотность (ОП) в испытуемых образцах сыворотки.

Методы

Получение поликлональных антител. Поликлональные антитела к GNR-098 получали путем парентеральной иммунизации препаратом GNR-098 самцов взрослых крыс (10 особей) линии Sprague Dawley (предоставлены виварием АО «ГЕНЕРИУМ»). Через 14 сут после иммунизации проводили эвтаназию животных, отбирали кровь и получали сыворотку. Исследование проводили в соответствии с требованиями Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях⁹.

Антитела выделяли из сыворотки крови с помощью метода аффинной хроматографии с использованием колонок с носителем Protein G (Cytiva, США) в соответствии с протоколом производителя.

Условия сорбирования антигена и инкубации. В качестве буфера для сорбирования антигена (GNR-098) в лунках иммунологических планшетов (Nunc, Германия) был использован карбонатно-бикарбонатный буфер pH 9,2–9,6 в объеме 100 мкл на лунку. Было отработано два протокола сорбирования GNR-098: быстрый – в течение 1 ч при 25 °С и перемешивании при скорости 250 об/мин с использованием термощейкера (Biosan, Латвия), и ночной – в течение 12 ч при 4 °С.

Для блокирования свободных участков связывания в лунках полистироловых планшетов использовали 300 мкл ФСБ с добавлением полисорбата 20.

Получение конъюгата GNR-098. Использовали две схемы конъюгации GNR-098 с ПХ: 1) прямая конъюгация непосредственно с ПХ; 2) биотинилирование GNR-098 для последующего обнаружения с использованием конъюгата стрептавидин-ПХ. Конъюгацию проводили с применением коммерческих наборов в соответствии с инструкциями производителя.

⁸ https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44092/9789241597852_eng.pdf

⁹ European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS No.123. Strasbourg; 1986. <https://norecopa.no/media/2iydns5h/ets-123-original.pdf>

Кислотная диссоциация комплекса АЛА-антиген. Для диссоциации комплекса АЛА-антиген проводили его обработку раствором 2М глицина гидрохлорида (рН 2,0) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем переносили АЛА в лунки нового планшета и нейтрализовали кислоту добавлением раствора 2М трис-буфера.

Учет результатов. Учет результатов проводили на спектрофотометре xMark (BioRad, США) при длине волны 450 нм.

Дизайн исследования

Обнаружение АЛА осуществляли путем многостадийного анализа, включавшего последовательное уточнение данных на каждом этапе. На стадии скрининга выполняли качественное определение общих АЛА (оАЛА) в образце, затем подтверждали специфичность обнаруженных АЛА и проводили характеристику АЛА с установлением их титра, класса и нейтрализующей активности¹⁰ [6]. При разработке аналитических методик для обнаружения АЛА необходимо использовать положительные и отрицательные МО, а также учитывать возможное присутствие в исследуемых образцах терапевтического белка и/или его растворимой мишени, что может привести к возникновению ложноположительных результатов [8, 9, 11].

Скрининг-тест. Для обнаружения АЛА к GNR-098 применяли метод ИФА, использованный производителем оригинального препарата Эйлеа. АЛА из образцов сыворотки крови иммобилизовали путем связывания с антигеном (GNR-098), сорбированным на твердой фазе. Иммобилизованные АЛА детектировали с использованием меченого антигена. Антивидовые антитела к иммуноглобулинам человека на данном этапе не применялись, поскольку это потребовало бы использования положительных контрольных образцов (сыворотки крови человека с подтвержденным наличием АЛА).

Рассматривали два варианта постановки ИФА: сэндвич-вариант и мостиковый вариант. В сэндвич-варианте ИФА меченый антиген сорбировали третьим слоем поверх иммобилизованных АЛА. В мостиковом варианте комплексы АЛА-антиген предварительно диссоциировали с последующей сорбцией АЛА на новой подложке. Для проведения дальнейших исследований был выбран мостиковый вариант ИФА, поскольку в нем была продемонстрирована более высокая чувствительность. Это можно объяснить тем, что в сэндвич-варианте ИФА часть эпитопов АЛА

участвует в связывании с антигеном нижнего слоя, а оставшиеся свободные эпитопы экранируются, что снижает эффективность обнаружения.

Подтверждающий тест. Подтверждающий тест включал дополнительный этап инкубации образцов с избытком антигена с целью истощения специфичных АЛА в образце. Это приводило к снижению аналитического сигнала в подтверждающем тесте по сравнению со скрининг-тестом. Добавление антигена в концентрации 200 мкг/мл позволило уменьшить аналитический сигнал ВПО на 95%.

Определение титра общих АЛА. Титрование выполнялось с сохранением постоянной доли биологической матрицы в буферном растворе для разведения испытуемых образцов сыворотки. Для обеспечения точности вычисления титра интервалы титрования подбирались так, чтобы коэффициенты кратности разведений в предполагаемом диапазоне титров не превышали 2,5.

Определение классов общих АЛА. Методика определения изотипа общих АЛА основана на скрининг-тесте и отличается используемым конъюгатом, а также внесением ПМО после кислотной диссоциации. Основная трудность при определении изотипа антител заключается в отсутствии положительных контрольных образцов человеческой сыворотки. Так как коммерческие иммуноглобулины к определенным классам антител не являются АЛА к терапевтическому белку, при выявлении классов общих АЛА возможен только качественный результат. Методы изотипирования общих АЛА обладают меньшей чувствительностью по сравнению со скрининговыми методами, поскольку выявляют лишь часть антител из общего пула.

Валидация методики

Параметры валидации. Цель валидации — подтвердить, что методика позволяет надежно и воспроизводимо определять общие АЛА к GNR-098 в биологической матрице (сыворотка крови). Согласно принципу «соответствия назначению» (fit for purpose) был определен перечень валидируемых параметров методики: пределы исключения методик (ПИМ, cut-point); прецизионность (повторяемость и воспроизводимость); предел обнаружения (ПО); устойчивость к присутствию в образцах растворимой мишени терапевтического белка; специфичность; эффект матрицы; минимальное необходимое разведение (МНР); стабильность; устойчивость к замене ключевого компонента; эффект сверхдозы (хук-эффект).

¹⁰ <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunogenicity-testing-therapeutic-protein-products-developing-and-validating-assays-anti-drug>

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили при помощи программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., США) и Microsoft Office Excel 2016. Для каждого тестируемого образца значение ОП в повторностях усредняли и рассчитывали коэффициент вариации (coefficient of variation, CV, %).

Пределы исключения методик. ПИМ служат для разделения образцов на отрицательные и положительные. Для расчета ПИМ оценивали нормальность распределения значений ОП с учетом требований риск-ориентированного подхода. ПИМ устанавливали на уровне, допускающем получение до 5% ложноположительных результатов, что гарантирует обнаружение истинно положительных образцов с низкой концентрацией. Графическое представление алгоритма расчета представлено на рисунке S1 (опубликовано на сайте журнала¹¹).

Для оценки вариабельности значений аналитического сигнала исследовали образцы сыворотки от 60 здоровых доноров (для методики определения классов иммуноглобулинов использовали сыворотки от 45 доноров) в двух повторностях в шести независимых опытах с участием двух аналитиков. Образцы со значением CV более 20% признавали статистическими выбросами и исключали из расчетов. Дополнительно определение статистических выбросов проводили с использованием межквартильного интервала. Оценку нормальности данных проверяли с помощью теста Д'Агостино – Пирсона¹².

При оценке вариабельности скрининг-теста, подтверждающего теста и определения АЛА класса IgE было установлено, что распределение данных является ненормальным и не поддается нормализации при помощи логарифмирования и удаления статистических выбросов. Поэтому ПИМ для скрининг-теста и определения АЛА класса IgE рассчитывали по формуле (1):

$$\text{ПИМ}_{\text{скрининг-тест}} = \frac{10^{99\text{-й процентиль (lg ОП)}}}{\text{ОП}}, \quad (1)$$

где ОП – среднее значение ОП.

Пробы, ОП которых превышала ПИМ, считали условно-положительными, поскольку специфичность обнаруженных АЛА необходимо подтвердить.

Для подтверждающего теста предельный уровень (%) незначимого ингибирования образца определяли по формуле (2):

$$\text{ПИМ}_{\text{подтверждающий тест}} = 100 - 10^{1\text{-й процентиль (lg И)}}, \quad (2)$$

где И – уровень ингибирования (%), определяемый по снижению отношения средней ОП образца в подтверждающем тесте по отношению к средней ОП того же образца в скрининг-тесте.

Пробы, условно-положительные в скрининг-тесте и одновременно имеющие уровень ингибирования, превышающий ПИМ подтверждающего теста, считали положительными.

Прецизионность. Оценивали степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в установленных условиях. Для скрининг-теста, подтверждающего теста и определения титров оценивали прецизионность внутри аналитических циклов (повторяемость) и между ними (воспроизводимость). Повторяемость методик скрининг-теста и подтверждающего теста оценивали при исследовании шести МНР для каждого из трех ПМО в одном опыте одним аналитиком. Повторяемость определения титра оАЛА оценивали при исследовании 9 повторностей (серий разведений) для каждого ПМО. Воспроизводимость исследовалась двумя аналитиками в шести независимых опытах с оценкой трех ПМО в двух повторностях.

Нормированные коэффициенты (K) для каждого ПМО в скрининг-тесте рассчитывали по формуле (3):

$$K = \frac{\overline{\text{ОП}}_{\text{ПМО}}}{\text{ПИМ}_{\text{скрининг-тест}}}, \quad (3)$$

где $\text{ПИМ}_{\text{скрининг-тест}}$ – предел исключения методики скрининг-теста; $\overline{\text{ОП}}_{\text{ПМО}}$ – среднее значение ОП для ПМО. Критерий приемлемости результатов – CV менее 20% для каждого ПМО при оценке повторяемости и воспроизводимости.

Для оценки воспроизводимости подтверждающего теста расчет уровня ингибирования (И, %) каждого ПМО проводили по формуле (4):

$$\text{И} = 100 \times \left(1 - \frac{\overline{\text{ОП}}_{\text{ПТ}}}{\overline{\text{ОП}}_{\text{СКР}}} \right), \quad (4)$$

где $\overline{\text{ОП}}_{\text{ПТ}}$ – среднее значение ОП для ПМО в подтверждающем тесте; $\overline{\text{ОП}}_{\text{СКР}}$ – среднее значение ОП для ПМО в скрининг-тесте.

Критерий приемлемости результатов – CV менее 20% для каждого ПМО при оценке повторяемости и воспроизводимости.

Для оценки прецизионности при определении титра АЛА расчет проводили по формуле (5):

¹¹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-631-fig-s1>

¹² https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_choosing_a_normality_test.htm

$$\text{Титр} = R_H + \frac{(\overline{\text{ОП}}_H - \text{ПИМ}_{\text{скрининг-тест}}) \times (R_L - R_H)}{\overline{\text{ОП}}_H - \overline{\text{ОП}}_L}, \quad (5)$$

где титр — максимальное разведение образца, при котором его ОП превышает значение ПИМ_{скрининг-тест}; $\overline{\text{ОП}}_H$ — среднее значение ОП для НМО; ПИМ_{скрининг-тест} — предел исключения методики скрининг-теста; R_H — максимальный коэффициент разведения ПМО, средняя ОП которого выше предельного значения; R_L — минимальный коэффициент разведения ПМО, средняя ОП которого ниже предельного значения; $\overline{\text{ОП}}_H$ — среднее значение ОП для ПМО в максимальном разведении, превышающее предельное значение скрининг-теста; $\overline{\text{ОП}}_L$ — среднее значение ОП для ПМО в минимальном разведении, ниже предельного значения скрининг-теста.

При оценке повторяемости рассчитывали медиану титра каждого ПМО. Критерием приемлемости результатов являлось различие максимального и минимального титров каждого ПМО не более чем в 3 раза от рассчитанной медианы.

Предел обнаружения. При оценке ПО (нг/мл) для методики обнаружения оАЛА расчет проводили по формуле (6):

$$\text{ПО} = \overline{\text{ПО}}_{\text{опыт}} + 3 \times \text{SD}, \quad (6)$$

где $\overline{\text{ПО}}_{\text{опыт}}$ — усредненное значение ПО в шести независимых опытах, нг/мл; SD — стандартное отклонение. $\overline{\text{ПО}}_{\text{опыт}}$ определяли по формуле (7):

$$\overline{\text{ПО}}_{\text{опыт}} = \frac{\text{Концентрация}}{\text{Титр}} \times \text{МНР}, \quad (7)$$

где МНР — минимальное необходимое разведение; концентрация — концентрация ПМО, нг/мл.

Устойчивость к присутствию в образцах сыворотки растворимой мишени терапевтического белка. Присутствие в исследуемых образцах сыворотки GNR-098 (в несвязанной форме) и/или его растворимой мишени (VEGF) может снижать чувствительность методики. Риск влияния присутствия GNR-098 был признан незначительным, поскольку препарат вводится интравитреально. VEGF, постоянно присутствующий в системном кровотоке, способен связывать свободный GNR-098. Для оценки влияния VEGF на чувствительность проводили анализ образцов с добавлением препаратов рекомбинантного человеческого VEGF (hrVEGF₁₆₅) от двух производителей в скрининг-тесте. Для образцов, содержащих VEGF, рассчитывали коэффициент выявления (R , %). Критерием приемлемости результатов служило попадание величины R в диапазон значений от 75 до 125%.

Эффект матрицы. Устойчивость к матричным эффектам (неспецифическое ингибирование связывания АЛА с антигеном) оценивали в скрининг-тесте и подтверждающем тесте на 13 образцах, содержащих АЛА в концентрации 280 нг/мл. Критерием приемлемости результатов считалось получение условно положительного результата в скрининг-тесте и в подтверждающем тесте (ОП и уровень ингибирования выше соответствующих ПИМ) не менее чем для 80% испытуемых МО.

Минимальное необходимое разведение. Разведение испытуемых образцов сыворотки в буферном растворе применяется с целью снижения неспецифического влияния матрицы и экономии материала.

Специфичность. Для оценки специфичности методик обнаружения оАЛА и определения титра антител исследовали МО, содержащие неспецифические к GNR-098 АЛА (специфические к двум другим препаратам). Один из МО содержал АЛА к моноклональному антителу, направленному на ту же биологическую мишень, что и GNR-098. Специфичность подтверждающего теста оценивали путем внесения в ПМО непосредственно этих двух препаратов. Специфичность теста на определения АЛА класса IgE оценивали с использованием МО, содержащих антитела классов IgG и IgM человека.

Стабильность. Для подтверждения стабильности значений ОП образцов при хранении, транспортировке и проведении анализа исследовали МО в различных условиях хранения:

- в холодильной камере в течение 16 ч: замораживание при температуре не выше минус 70 °С, размораживание, инкубация в течение 16 ч в холодильной камере при температуре 5±3 °С;
- при комнатной температуре в течение 16 ч: замораживание при температуре не выше минус 70 °С, размораживание, инкубация в течение 16 ч при комнатной температуре;
- после нескольких циклов замораживания/размораживания: замораживание при температуре не выше минус 70 °С, размораживание при комнатной температуре и повторное замораживание (3 цикла).

В отдельном эксперименте анализировали МО после длительного хранения: замораживание на 14 сут при температуре не выше минус 20 °С и хранение в течение 3,5 мес. при температуре не выше минус 70 °С.

Все анализируемые МО сравнивали со свежеприготовленными МО. Для каждого МО после хранения рассчитывали коэффициент выявления (R , %) относительно свежеприготовленных образцов по формуле (8):

$$R = \frac{\overline{\text{ОП}}_{\text{после хранения}}}{\overline{\text{ОП}}_{\text{до хранения}}} \times 100, \quad (8)$$

где $\overline{\text{ОП}}$ — среднее значение оптической плотности образцов до и после хранения. Критерием приемлемости результатов служило попадание величины R в диапазон значений от 80 до 120%.

Устойчивость к замене ключевого компонента. Сравнивали работоспособность методики определения титра ПМО при использовании GNR-098 и оригинального препарата. Критерием приемлемости результатов являлось попадание установленных значений титра ПМО в диапазон, рассчитанный при оценке воспроизводимости определения титров.

Эффект сверхдозы (хук-эффект). Высокие концентрации аналита в пробе могут приводить к получению ложноотрицательного результата (ОП образца ниже ПИМ). Наличие хук-эффекта проверяли в скрининг-тесте и подтверждающем тесте с использованием МО, содержащих АЛА в концентрации, пятикратно превышающей уровень ВПО.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики определения антилекарственных антител к биоаналогу афлиберцепта

На первом этапе разработки методики проводили подбор разведения сывороток, оптимального состава буферных растворов и выбор схемы проведения ИФА. Минимальное необходимое разведение составило 1:5. Выбран мостиковый вариант ИФА как показавший более высокую чувствительность.

Эффективность буферных растворов в снижении фоновой ОП негативных модельных образцов (фоновый сигнал) оценивали, сравнивая результаты измерения отношений ОП индивидуальных образцов сыворотки здоровых доноров к оптической плотности НМО (табл. S1, опубликована на сайте журнала¹³).

Использование ФСБ, содержащего полисорбат 20 и 1% БСА, позволило снизить среднее отношение ОП индивидуальных образцов сыворотки здоровых доноров к оптической плотности НМО на 33,2%, поэтому для разведения образцов был выбран этот буферный раствор.

При обнаружении АЛА использовали два варианта подготовки меченого антигена GNR-098. Проводили прямое конъюгирование

антигена с ПХ и биотинилирование с последующей детекцией при помощи конъюгата стрептавидина с ПХ. Было показано, что биотинилирование повысило чувствительность методики: отношение аналитического сигнала низкوپоложительных МО к сигналу НМО было на 22–44% выше по сравнению с конъюгатом GNR-098 с ПХ.

Далее проводили подбор параметров инкубации ИФА. Полученные результаты при использовании быстрого и ночного протокола сорбирования антигена GNR-098 оказались сопоставимы, а оптимальный диапазон его концентрации составил 5–10 мкг/мл. Длительность инкубации АЛА с избытком антигена в подтверждающем тесте удалось сократить до 30 мин благодаря высокой концентрации взаимодействующего антигена и проведению реакции в гомогенной фазе. Для блокирования неспецифического связывания в лунках полистироловых планшето́в оказалось достаточно инкубации в течение 30 мин.

Валидация методики определения антилекарственных антител к афлиберцепту

Определение предела исключения методики. Значения ПИМ, рассчитанные на основании ОП образцов (табл. S2–S4, опубликованы на сайте журнала в Приложении 1¹⁴) для скрининг-теста и определения АЛА класса IgE составили 1,3 и 1,2 соответственно, значение ПИМ для подтверждающего теста составило 15,2%.

Оценка прецизионности. Прецизионность скрининг-теста и подтверждающего теста рассчитывали на основании определения нормированного коэффициента и коэффициента вариации модельных образцов (табл. 1, 2). Прецизионность при определении титров рассчитывали на основании данных отклонения максимального и минимального титров каждого ПМО от рассчитанного медианного значения (табл. 3).

Значения коэффициентов вариации при оценке прецизионности скрининг-теста и подтверждающего теста не превышали 11%. Максимальные и минимальные титры для каждого ПМО вошли в рассчитанные референсные интервалы (табл. 3). Таким образом, прецизионность разработанной методики была подтверждена.

Оценка предела обнаружения. Рассчитанный ПО скрининг-теста для определения общих АЛА составил 185 нг/мл.

¹³ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-631-table-s1>

¹⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-631-annex>

Таблица 1. Оценка прецизионности методики (скрининг-тест)
Table 1. Assessment of precision of the method (screening assay)

Параметр <i>Parameter</i>	Образец / <i>Sample</i>		
	ВПО / <i>HPS</i>	СПО / <i>MPS</i>	НПО / <i>LPS</i>
Воспроизводимость / <i>Intermediate precision</i>			
$K_{\text{среднее}} / K_{\text{mean}}$	29,1	10,2	1,6
CV, %	9,4	8,3	8,1
Повторяемость / <i>Repeatability</i>			
$K_{\text{среднее}} / K_{\text{mean}}$	33,0	10,8	1,6
CV, %	4,0	11,0	9,5

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

Примечание. $K_{\text{среднее}}$ — среднее значение нормированного коэффициента K ; CV — коэффициент вариации. Варианты модельных образцов: ВПО — высокоположительный; СПО — среднеположительный; НПО — низкоположительный.
Note. K_{mean} , average value of the normalized coefficient K ; CV, coefficient of variation. Model sample types: HPS, highly positive sample; MPS, medium positive sample; LPS, low positive sample.

Таблица 2. Оценка прецизионности методики (подтверждающий тест)
Table 2. Assessment of precision of the method (confirmatory assay)

Параметр <i>Parameter</i>	Образец / <i>Sample</i>		
	ВПО / <i>HPS</i>	СПО / <i>MPS</i>	НПО / <i>LPS</i>
Воспроизводимость / <i>Intermediate precision</i>			
$I_{\text{среднее}}, \% / I_{\text{mean}}, \%$	94,0	90,4	53,5
CV, %	0,5	0,8	8,8
Повторяемость / <i>Repeatability</i>			
$I_{\text{среднее}}, \% / I_{\text{mean}}, \%$	94,5	90,9	51,8
CV, %	0,2	0,9	5,8

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

Примечание. $I_{\text{среднее}}$ — среднее значение уровня ингибирования (%) для соответствующего образца; CV — коэффициент вариации. Варианты модельных образцов: ВПО — высокоположительный; СПО — среднеположительный; НПО — низкоположительный.
Note. I_{mean} , mean inhibition rate (%) for the respective sample; CV, coefficient of variation. Model sample types: HPS, highly positive sample; MPS, medium positive sample; LPS, low positive sample.

Оценку устойчивости к присутствию в образцах растворимой мишени терапевтического белка проводили путем анализа образцов с внесением к исходно присутствующему в сыворотке крови нативному VEGF экзогенного hrVEGF₁₆₅ до финальной концентрации 2000 пг/мл. Для всех испытанных МО значения коэффициента выявления R удовлетворяли установленным критериям приемлемости: для образцов, содержащих 2000 пг/мл hrVEGF₁₆₅, значения R находились в диапазоне от 91,5 до 104,2%.

Оценка специфичности. В скрининг-тесте и при определении АЛА класса IgE для всех МО, содержащих неспецифические АЛА, были получены отрицательные результаты (значения ОП образцов были ниже значений соответствующих ПИМ). В подтверждающем тесте для всех МО, содержащих неспецифические антигены, были

получены отрицательные результаты (уровень ингибирования ниже ПИМ).

Оценка эффекта матрицы. При анализе 13 модельных образцов, содержащих АЛА в концентрации 280 нг/мл, был зарегистрирован положительный результат в скрининг-тесте и подтверждающем тесте (значения ОП и уровень ингибирования выше соответствующих ПИМ). Таким образом, эффект матрицы отсутствовал.

Оценка стабильности. Для подтверждения стабильности МО проводили сравнительный анализ результатов измерения ОП свежеприготовленных ПМО и НМО и после их хранения (табл. 4).

Значения коэффициента выявления R при оценке стабильности МО составляли от 83 до 103%. Таким образом, поскольку полученные значения R удовлетворяли установленным критериям

Таблица 3. Оценка прецизионности методики (определение титра* общих антилекарственных антител с использованием модельных образцов)

Table 3. Assessment of precision of the method (total anti-drug antibodies titer* determination using the model samples)

Параметр <i>Parameter</i>	Образец / <i>Sample</i>		
	ВПО / <i>HPS</i>	СПО / <i>MPS</i>	НПО / <i>LPS</i>
Воспроизводимость / <i>Intermediate precision</i>			
Минимальный титр <i>Minimal titre</i>	1427	351	34
Максимальный титр <i>Maximal titre</i>	2291	506	45
Референсный интервал титра <i>Reference titre range</i>	725–4534	166–1039	15–92
Повторяемость / <i>Repeatability</i>			
Минимальный титр <i>Minimal titre</i>	1841	391	35
Максимальный титр <i>Maximal titre</i>	2544	538	42
Референсный интервал титра <i>Reference titre range</i>	970–3880	227–909	19–769

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

Примечание. Варианты модельных образцов: ВПО — высокоположительный; СПО — среднеположительный; НПО — низкоположительный. *, титр — максимальное разведение образца, при котором его оптическая плотность превышает предел исключения методики.

Note. Model sample types: HPS, highly positive sample; MPS, medium positive sample; LPS, low positive sample. *, titre is the maximal dilution of a sample, at which its optical density exceeds the cut-point.

приемлемости, стабильность МО при заданных условиях хранения была подтверждена.

Оценка устойчивости к замене ключевого компонента. Показано, что установленные значения титров ПМО, полученные при использовании GNR-098 и оригинального препарата, входили в допустимый диапазон, рассчитанный при оценке воспроизводимости определения титров. Устойчивость разработанной методики к замене ключевого компонента была подтверждена для всех исследованных МО.

Оценка эффекта сверхдозы. При анализе образцов, содержащих АЛА в пятикратно превышающей ВПК концентрации, не было получено ложноотрицательных результатов в скрининг-тесте и подтверждающем тесте. Таким образом, эффект сверхдозы не был обнаружен.

Сравнение разработанной методики определения антилекарственных антител с коммерческими наборами

В коммерческих ИФА тест-системах, предназначенных для выявления антител к афлиберцепту (например, производства Bio-Rad, Abcam и др.), используются в качестве ПМО моноклональные антитела с одинаковой для всех клонов специфичностью и авидностью. Однако МО с добавленными в них моноклональными антителами не являются релевантной моделью

для воспроизведения полученных от пациентов положительных по наличию антител к афлиберцепту образцов, поскольку последние содержат уникальные и различные по клональности, авидности, изотипическому составу и нейтрализующей активности комбинации антител.

Предлагаемая авторами комплексная аналитическая методика позволяет решить данную проблему за счет использования поликлональных антител и включает четыре теста для обнаружения и поэтапной характеристики оАЛА: скрининг-тест, подтверждающий тест, определение титра оАЛА и принадлежности их к классу IgE. Разработанная методика позволит провести оценку иммуногенности афлиберцепта.

Важным аспектом оценки иммуногенности представляется определение содержания фракции нейтрализующих антител в составе оАЛА, поэтому в дальнейшем предполагается разработать дополнительную аналитическую методику для их детекции.

ВЫВОДЫ

1. Разработана комплексная аналитическая методика для иммуоферментного обнаружения и поэтапной характеристики общих антилекарственных антител к афлиберцепту (препарат GNR-098) в образцах сыворотки крови человека, включающая скрининг-тест,

Таблица 4. Оценка стабильности модельных образцов при разных условиях хранения
Table 4. Assessment of stability of model samples on different storage conditions

Эксперимент <i>Experiment</i>	Параметр <i>Parameter</i>	Образцы / <i>Samples</i>			
		ВПО / <i>HPS</i>	СПО / <i>MPS</i>	НПО / <i>LPS</i>	НМО / <i>NMS</i>
Стабильность при краткосрочном хранении <i>Short-term stability</i>	Свежеприготовленные образцы / <i>Freshly prepared samples</i>				
	$\overline{OP} / \overline{OD}$	1,737	0,562	0,107	0,056
	<i>R</i> , %	–	–	–	–
	Хранение в холодильной камере в течение 16 ч при 5±3 °С / <i>Refrigerated for 16 hours at 5±3 °C</i>				
	$\overline{OP} / \overline{OD}$	1,732	0,564	0,100	0,054
	<i>R</i> , %	100	101	93	96
	Хранение при комнатной температуре в течение 16 ч / <i>Storage at room temperature for 16 hours</i>				
	$\overline{OP} / \overline{OD}$	1,908	0,598	0,104	0,055
	<i>R</i> , %	110	107	97	98
	После замораживания/размораживания / <i>After freeze-thaw</i>				
	$\overline{OP} / \overline{OD}$	1,795	0,548	0,104	0,055
	<i>R</i> , %	103	98	98	98
Стабильность при долгосрочном хранении <i>Long-term stability</i>	Свежеприготовленные образцы / <i>Freshly prepared samples</i>				
	$\overline{OP} / \overline{OD}$	2,165	0,730	0,114	0,057
	<i>R</i> , %	–	–	–	–
	После долгосрочного хранения / <i>After long-term storage</i>				
	$\overline{OP} / \overline{OD}$	2,165	0,624	0,096	0,056
	<i>R</i> , %	83	86	83	97

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

Примечание. $\overline{OP}$ – среднее значение оптической плотности; *R* – коэффициент выявления; «–» – не применимо. Варианты модельных образцов: ВПО – высокоположительный образец; СПО – среднеположительный образец; НПО – низкоположительный образец; НМО – негативный модельный образец.

Note. $\overline{OD}$, mean optical density; *R*, detection coefficient; –, not applicable. Model sample variants: HPS, highly positive sample; MPS, medium positive sample; LPS, low positive sample; NMS, negative model sample.

подтверждающий тест, а также тест для определения титра АЛА и их принадлежности к классу IgE.

- Установленные валидационные характеристики удовлетворяли критериям приемлемости. Пределы исключения методик для скрининг-теста и теста определения АЛА класса IgE составили 1,3 и 1,2 соответственно; для подтверждающего теста – 15,2%. Значения коэффициентов вариации при оценке прецизионности не превышали 11%. Предел обнаружения скрининг-теста составил 185 нг/мл. Минимально необходимое разведение для испытуемых образцов – 1:5. Значения коэффициента выявления *R* при оценке устойчивости к присутствию 2000 пг/мл hrVEGF₁₆₅ находились в диапазоне от 91,5 до 104,2%. При оценке специфичности методики в ходе анализа модельных об-

разцов, содержащих неспецифические АЛА, были получены отрицательные результаты. Продемонстрировано отсутствие эффекта матрицы для всех модельных образцов, содержащих АЛА в концентрации 280 нг/мл. Значения коэффициента выявления *R* при оценке стабильности модельных образцов были в диапазоне от 83 до 103%. Значения титров положительных модельных образцов, полученные при использовании GNR-098 и оригинального препарата, входили в диапазон, рассчитанный при оценке воспроизводимости определения титров, что свидетельствует об устойчивости разработанной методики к замене ключевого компонента. Эффект сверхдозы не был обнаружен.

- Разработанная аналитическая система позволяет провести оценку иммуногенности афлиберцепта (препарат GNR-098).

Литература/References

1. Veritti D, Sarao V, Gorni G, Lanzetta P. Anti-VEGF drugs dynamics: Relevance for clinical practice. *Pharmaceutics*. 2022; 14(2):265. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020265>
2. Anguita R, Tasiopoulou A, Shahid S, Roth J, Sim SY, Patel PJ. A review of aflibercept treatment for macular disease. *Ophthalmol Ther*. 2021;10(3):413–28. <https://doi.org/10.1007/s40123-021-00354-1>
3. Sharma A, Kumar N, Parachuri N, Bandello F, Kuppermann BD. Immunogenicity: Clouding the future of intravitreal therapy. *Ocul Immunol Inflamm*. 2022;31(9):1746–9. <https://doi.org/10.1080/09273948.2022.2139273>
4. Gyenes A, Istvan L, Benyo F, Papp A, Resch M, Sandor N, et al. Intraocular neutralizing antibodies against aflibercept in patients with age related macular degeneration. *BMC Ophthalmol*. 2023;23(1):14. <https://doi.org/10.1186/s12886-022-02761-9>
5. Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, Chakravarthy U. Age-related macular degeneration: A review. *JAMA*. 2024; 331(2):147–57. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.26074>
6. Harris C.T, Cohen, S. Reducing immunogenicity by design: Approaches to minimize immunogenicity of monoclonal antibodies. *BioDrugs*. 2024;38(3):205–26. <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00641-2>
7. Koren E, Smith HW, Shores E, Shankar G, Finco-Kent D, Rup B, et al. Recommendations on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods*. 2008;333(1–2): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.01.001>
8. Иванов Р, Секарева Г, Кравцова О, Кудлай Д, Лукьянов С, Тихонова И и др. Правила проведения исследований биоаналоговых лекарственных средств (биоаналогов). *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2014;(1):21–36. Ivanov R, Sekareva G, Kravtsova O, Kudlay D, Lukyanov S, Tikhonova I, et al. Guidelines of research biosimilar drugs. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2014;(1):21–36 (In Russ). EDN: SYTXJB
9. Pineda C, Castaneda Hernandez G, Jacobs IA, Alvarez DF, Carini C. Assessing the immunogenicity of biopharmaceuticals. *BioDrugs*. 2016;30(3):195–206. <https://doi.org/10.1007/s40259-016-0174-5>
10. Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48(5):1267–81. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.020>
11. Carter PJ, Rajpal A. Designing antibodies as therapeutics. *Cell*. 2022;185(15):2789–805. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.05.029>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены рисунок S1, таблица S1 и Приложение 1. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-631-fig-s1> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-631-table-s1> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-631-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.В. Шевченко** — концепция работы, проведение экспериментальных исследований, написание текста рукописи; **А.Е. Лисова** — критическое обсуждение текста рукописи; **А.А. Агафонова, И.М. Алаева** — проведение экспериментальных исследований; **К.А. Смолова** — выделение и очистка антител; **И.Ю. Жуков** — анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; **А.А. Казаров** — статистическая обработка данных; **И.В. Лягоскин** — утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Additional information. Figures S1, Table S1 and Supplement 1 are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-631-fig-s1> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-631-table-s1> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-631-annex>

Authors' contribution. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows: **I.V. Shevchenko** conceptualised the study, performed the experiments, drafted the manuscript. **A.E. Lisova** critically discussed the manuscript. **A.A. Agafonova** and **I.M. Alaeva** performed the experiments. **K.A. Smolova** extracted and purified antibodies. **I.Yu. Zhukov** analysed literature data and edited the manuscript. **A.A. Kazarov** performed statistical data processing. **I.V. Lyagoskin** approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Шевченко Иван Вячеславович, канд. биол. наук / **Ivan V. Shevchenko**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6482-7814>

Лисова Алена Евгеньевна / **Alena E. Lisova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-1232-5660>

Агафонова Алена Алексеевна / **Alena A. Agafonova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-9163-7991>

Смолова Ксения Александровна, канд. биол. наук / **Ksenia A. Smolova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9135-9673>

Алаева Ирина Михайловна / **Irina M. Alaeva**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-4244-1106>

Жуков Иван Юрьевич, канд. биол. наук / **Ivan Yu. Zhukov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3817-2129>

Казаров Александр Александрович / **Aleksandr A. Kazarov**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0682-6113>

Лягоскин Иван Владимирович, канд. биол. наук / **Ivan V. Lyagoskin**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9058-1106>

Поступила 05.11.2024

После доработки 29.05.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Online first 28.08.2025

Received 5 November 2024

Revised 29 May 2025

Accepted 6 June 2025

Online first 28 August 2025



Стандартизация лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека: гармонизация Государственной фармакопеи Российской Федерации с мировыми стандартами качества

О.А. Демидова[✉], О.Г. Корнилова, В.Л. Багирова

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

✉ Демидова Ольга Александровна; demidova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Медицинское применение лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека (ЛП ИГЧ) обусловлено их высокой эффективностью в терапии аутоиммунных, иммунодефицитных, воспалительных заболеваний и профилактике заболеваний различной этиологии. Гармонизация национальных стандартов качества на ЛП ИГЧ с мировыми стандартами — одно из приоритетных направлений совершенствования принципов лекарственного обеспечения населения Российской Федерации. Действующие стандарты качества на ЛП ИГЧ нуждаются в актуализации из-за существенных различий в оценке показателей качества с ведущими фармакопеями мира.

ЦЕЛЬ. Систематизация и анализ национальных и международных фармакопейных требований к контролю показателей качества ЛП ИГЧ в рамках гармонизации Государственной фармакопеи Российской Федерации с мировыми стандартами качества для разработки проектов фармакопейных статей по иммуноглобулинам человека.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проанализированы монографии зарубежных фармакопей на ЛП ИГЧ: 14 монографий в Европейской и Британской фармакопеях, 7 — Индийской фармакопеи, 12 — Китайской фармакопеи. Показана обеспеченность по количеству стандартами качества на ЛП ИГЧ в региональных и ряде национальных фармакопей мира. Установлено, что в Европейской, Британской, Индийской фармакопеях отсутствуют общие монографии на ЛП ИГЧ, тогда как Китайская фармакопея включает 2 общие монографии. Наибольшее количество монографий на специфические ИГЧ представлены в Европейской и Британской фармакопеях. В настоящее время в фармакопее США отсутствуют монографии на ЛП ИГЧ. Учитывая современные тенденции гармонизации национальных фармакопейных требований с региональными, проведен анализ фармакопейных требований к качеству ЛП ИГЧ Государственной фармакопеи Российской Федерации и Европейской фармакопеи, которая признана базовой. В ходе сравнительного анализа российских стандартов качества выявлено различие по наиболее важным показателям качества, таким как активатор прекалликреина, антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В, иммуноглобулин А (для ИГЧ нормального для внутримышечного и подкожного введения), антитела к вирусу гепатита А (для ИГЧ для внутримышечного введения). Показаны различия существующих подходов к оценке качества и, следовательно, необходимость гармонизации российских стандартов качества ЛП ИГЧ с международными требованиями по некоторым показателям качества, а также в части совершенствования подходов к обеспечению их качества и унификации методов контроля. На основе проведенного анализа фармакопейных требований к качеству ЛП ИГЧ подготовлены проекты общей фармакопейной статьи и фармакопейных статей на ЛП ИГЧ нормальных по способу применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Результаты сравнительного анализа фармакопейных требований указали на необходимость гармонизации российских стандартов качества ЛП ИГЧ с фармакопеями ведущих стран мира, в первую очередь с Европейской фармакопеей. Разработанные проекты фармакопейных статей были гармонизированы с мировыми аналогами и предусматривают использование современных методов оценки показателей качества. Для дальнейшей стандартизации методик определения отдельных показателей качества ЛП ИГЧ требуется разработка фармакопейных стандартных образцов.

Ключевые слова: стандартизация; иммуноглобулины человека; общая фармакопейная статья; фармакопейная статья; фармакопейные требования; гармонизация; методы контроля качества; Государственная фармакопея Российской Федерации; Европейская фармакопея; Фармакопея США

Для цитирования: Демидова О.А., Корнилова О.Г., Багирова В.Л. Стандартизация лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека: гармонизация Государственной фармакопеи Российской Федерации с мировыми стандартами качества. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):296–306. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-296-306>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200096-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Standardisation of human immunoglobulin preparations: Harmonising Russian State pharmacopoeia with world quality standards

Olga A. Demidova ✉, Olga G. Kornilova, Valeria L. Bagirova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Olga A. Demidova; demidova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Human immunoglobulin preparations (HIP) used in medicine effectively treat autoimmune diseases, inflammatory diseases, and immune deficiencies and prevent diseases of various aetiologies. Harmonising Russian national quality standards (monograph and general pharmacopoeial monographs) for HIP with world quality standards is one of priorities for improving medical supply in Russia. Current quality standards for HIP need to be revised due to significant differences from the leading world pharmacopoeias in what regards quality assessment.

AIM. This study aimed to systematise and analyse national and international compendial quality control requirements for HIP as part of aligning Russian State Pharmacopoeia with the world quality standards, in order to develop HIP monograph drafts.

DISCUSSION. 33 monographs for HIP have been analysed in several pharmacopoeias: 14 monographs in European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) and British Pharmacopoeia (BP), 7 — in Indian Pharmacopoeia (IP), and 12 — in Chinese Pharmacopoeia (ChP). The study has shown the number of quality standards for HIP in certain regional and national pharmacopoeias. Ph. Eur., BP, and IP were found to have no general chapters for HIP, while ChP included 2 general chapters. Ph. Eur. and BP showed the highest number of monographs on specific HIP. Currently, United States Pharmacopoeia (USP) shows no monographs on HIP. Considering a recent trend towards harmonisation of national and regional compendial requirements, the authors have analysed HIP quality requirements from Russian State Pharmacopoeia and Ph. Eur., recognised as the basic pharmacopoeia. A comparative analysis of Russian quality standards has shown differences in very important quality parameters, e.g. prekallikrein activator, antibodies to hepatitis B surface antigen, immunoglobulin A (normal HIP for intramuscular and subcutaneous administration), and antibodies to hepatitis A virus (HIP for intramuscular administration). The study

also showed the difference in the existing quality assessment approach, and the resulting need to align Russian and international quality requirements for HIP, improve quality assurance, and unify control methods. The completed analysis of compendial quality requirements for HIP was used to prepare the drafts of the general chapter monographs on normal HIP as per administration.

CONCLUSIONS. Comparative analysis of compendial requirements shows the need to harmonise Russian quality standards for HIP with the leading world pharmacopoeias, primarily Eur. Pharm. The developed drafts of the monographs have been aligned with their counterparts around the world and include up-to-date methods of quality assessment. Further HIP standardisation requires new compendial references.

Keywords: standardization; human immunoglobulins; general pharmacopoeial monograph; pharmacopoeial monograph; pharmacopoeial requirements; harmonization; quality control methods; State Pharmacopoeia of the Russian Federation; European Pharmacopoeia; United States Pharmacopoeia

For citation: Demidova O.A., Kornilova O.G., Bagirova V.L. Standardisation of human immunoglobulin preparations: Harmonising Russian State pharmacopoeia with world quality standards. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):296–306. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-296-306>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022200096-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные препараты (ЛП) иммуноглобулинов человека (ИГЧ) применяют для иммунопрофилактики и/или в качестве заместительной терапии для лечения пациентов с первичными и вторичными иммунодефицитными состояниями, обеспечивая пассивный иммунитет, пациентов с аутоиммунными и воспалительными заболеваниями, а также для профилактики заболеваний различной этиологии [1–4].

Согласно Федеральному закону № 61-ФЗ¹ иммуноглобулины человека относятся к биологическим ЛП, действующее вещество которых выделено из биологического источника и для определения качества которых необходима комбинация биологических и физико-химических методов. В решении Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) № 89² приводится определение биологических ЛП как ЛП, действующее вещество которых произведено или выделено из биологического источника и для характеристики свойств и контроля качества которых необходимо сочетание биологических и физико-химических методов анализа с оценкой произ-

водственного процесса и методов его контроля. Иммуноглобулины человека как ЛП в зависимости от специфичности антител подразделяют на нормальные, специфические [5] и специального назначения³. В состав ЛП ИГЧ нормальных входят иммуноглобулины преимущественно класса G (IgG), полученные из пула плазмы крови не менее 1000 здоровых доноров с помощью методов с доказанной эффективностью выделения фракции иммуноглобулина G⁴ [6, 7]. Для получения специфических иммуноглобулинов и иммуноглобулинов специального назначения количество доноров не ограничено.

В настоящее время в Государственный реестр лекарственных средств (ГРЛС)⁵ включено более 50 наименований ЛП ИГЧ российского и зарубежного производств, которые выпускают в виде следующих лекарственных форм (ЛФ): растворы для инфузий, для внутривенного [8, 9], внутримышечного и подкожного введения; лиофилизаты для приготовления растворов для внутривенного [8, 9], внутримышечного, подкожного введения и для приема внутрь. ИГЧ также могут входить в состав комплексных биологических ЛП.

¹ Федеральный закон Российской Федерации от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (п. 6.2 введен Федеральным законом Российской Федерации от 22.12.2014 № 429-ФЗ).

² Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического Союза».

³ ОФС.1.8.1.0003.15 Иммуноглобулины человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

⁴ 0918 Human normal immunoglobulinum for intravenous administration. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

⁴ 0338 Human normal immunoglobulinum for intramuscular administration. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

⁴ 2788 Human normal immunoglobulinum for subcutaneous administration. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

⁵ <http://grls.rosminzdrav.ru>

Данные ЛП включены в «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения»⁶. Стратегией развития фармацевтической промышленности, известной как «Фарма-2030»⁷, предусмотрена оптимизация системы обращения лекарственных средств (ЛС), гарантирующая их качество, эффективность и безопасность, а также конкурентоспособность на внутреннем и мировых рынках. В документе отмечается, что одним из приоритетов является обеспечение лекарственной независимости Российской Федерации. Согласно Резолюции от 12.02.2016 № АД-П12-718 об обеспечении выполнения поручений Президента России о дополнительных мерах по развитию фармацевтической промышленности от 07.02.2016 № Пр-226 отечественные ЛП ИГЧ являются приоритетными в предложениях по увеличению объемов их производства по полному технологическому циклу. Кроме импортозамещения ЛП ИГЧ, в Стратегии «Фарма-2030»⁸, положениях постановления Правительства Российской Федерации⁹ и Приказе Минздрава России¹⁰ отмечается, что курс на обеспечение независимости фармацевтического рынка Российской Федерации в условиях введения в отношении Российской Федерации ограничительных мер экономического характера диктует необходимость разработки как фармакопейных стандартных образцов (ФСО) для проведения контроля качества ЛС, являющихся полноценной заменой международным, так и соответствующих требований к качеству ЛП.

Учитывая возрастающую роль биологических ЛП в терапевтической практике и то, что степень гармонизации нормативной базы и требований к их качеству в настоящее время недостаточна, данное направление стандартизации представляется перспективным для развития ГФ РФ и может быть выделено в качестве одного

из приоритетных направлений стандартизации [10, 11]. Требования к качеству ЛП ИГЧ регламентированы фармакопеей (общими фармакопейными статьями и фармакопейными статьями). Несмотря на разнообразие ЛФ ЛП ИГЧ, основные требования обусловлены особенностями действующего вещества и исходного сырья. В настоящее время в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ) включены: общая фармакопейная статья (ОФС) ОФС.1.8.1.0003.15 «Иммуноглобулины человека», фармакопейные статьи (ФС) — ФС.3.3.2.0008.15 «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения» и ФС.3.3.2.0007.15 «Иммуноглобулин человека нормальный», которые нуждаются в актуализации из-за существенных различий в оценке некоторых показателей качества с требованиями ведущих фармакопей. Следовательно, необходимо изучение фармакопейных требований к качеству ЛП ИГЧ в зарубежных фармакопеях с целью гармонизации содержания разделов ОФС и ФС, требований к производству и испытаниям ЛП, изложенных в ГФ РФ и фармакопеях ведущих стран мира, в первую очередь Европейской фармакопее.

В соответствии со статьей 5 Соглашения о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС) от 23.12.2014 Коллегия ЕЭК утвердила Концепцию гармонизации фармакопей государств — членов ЕАЭС¹¹.

В соответствии с концепцией¹² гармонизация государственных фармакопей государств-членов проводится с учетом международного опыта и национальных фармакопейных требований. При этом в качестве базовой (основная фармакопея первого уровня) признана Европейская фармакопея ввиду полной гармонизации с ней фармакопей трех государств-членов¹³.

Цель работы — систематизация и анализ национальных и международных фармакопейных

⁶ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 12.10.2019 № 2406-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи». Приложение № 1.

⁷ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 07.06.2023 № 1495-р «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 г». <http://static.government.ru/media/files/HqCzKkoTf7fzVdKSYbhNiZHZWTEAAQ3p.pdf>

⁸ Там же.

⁹ Постановление Правительства Российской Федерации от 23.03.2022 № 440 «Об утверждении особенностей внесения изменений в документы, содержащиеся в регистрационном досье на зарегистрированный лекарственный препарат для медицинского применения, в случае дефектуры или риска возникновения дефектуры лекарственных препаратов в связи с введением в отношении Российской Федерации ограничительных мер экономического характера».

¹⁰ Приказ Минздрава России от 20.03.2020 № 202 «О метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения».

¹¹ Решение Коллегии ЕЭК от 22.09.2015 № 119 «О Концепции гармонизации фармакопей государств — членов Евразийского экономического союза».

¹² Там же.

¹³ Там же.

требований к контролю показателей качества ЛП ИГЧ в рамках гармонизации Государственной фармакопеи Российской Федерации с мировыми стандартами качества для разработки проектов фармакопейных статей по иммуноглобулинам человека.

Поиск информации осуществлялся по следующим источникам: базы данных eLIBRARY.RU и PubMed, ГФ РФ XIII и XIV изданий, монографии ведущих зарубежных фармакопей (Европейская фармакопея, Британская фармакопея, фармакопея США, Индийская фармакопея, Китайская фармакопея).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Анализ мировых стандартов качества на лекарственные препараты иммуноглобулина человека

Требования к показателям качества ЛП ИГЧ и методики их испытаний изложены в зарубежных фармакопеях в виде монографий. В Европейской фармакопее (Ph. Eur.), Британской фармакопее (BP), Индийской фармакопее (IP) общая монография на ЛП ИГЧ отсутствует. Фармакопейные требования описаны в индивидуальных монографиях в зависимости от способа применения.

Европейская фармакопея

Согласно Ph. Eur. ЛП ИГЧ нормальных в зависимости от способа применения представлены в 3 монографиях¹⁴, в которых указаны все фармакопейные требования к качеству иммуноглобулинов нормальных. Все специфические иммуноглобулины должны соответствовать требованиям качества иммуноглобулинов нормальных с учетом их пути введения в организм, а также требованиям к их активности, особенностям

производства, указанным в частных монографиях. На специфические иммуноглобулины человека в Ph. Eur. включено 11 частных монографий, в том числе «Иммуноглобулин человека антирезус Rh₀(D)»¹⁵, «Иммуноглобулин человека антирезус Rh₀(D) для внутривенного введения»¹⁶, «Иммуноглобулин человека против гепатита А»¹⁷ и др.¹⁸

Индийская фармакопея

В IP включены 2 монографии на ИГЧ в зависимости от способа применения («Иммуноглобулин человека нормальный»¹⁹ распространяется на ЛП ИГЧ нормальных для внутримышечного и подкожного введения и «Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения»²⁰), а также 5 частных монографий на специфические иммуноглобулины²¹.

Монографии на ИГЧ в Ph. Eur. и IP не гармонизированы, и между ними существует ряд отличий. Так, в соответствии с IP раздел «Идентификация» содержит описание двух методов: иммунодиффузия в геле и иммуноэлектрофорез в геле. Подлинность (видоспецифичность) подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека методом иммунодиффузии в геле и наличием основного компонента IgG методом иммуноэлектрофореза. В соответствии с Ph. Eur. подлинность подтверждают наличием основного компонента, соответствующего IgG сыворотки крови человека, с помощью подходящего метода иммуноэлектрофореза.

Британская фармакопея

Согласно BP оценку качества ЛП ИГЧ нормальных в соответствующей ЛФ проводят на основе трех монографий, а именно

¹⁴ 0918 Human normal immunoglobulinum for intravenous administration. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024. 0338 Human normal immunoglobulinum for intramuscular administration. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024. 2788 Human normal immunoglobulinum for subcutaneous administration. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

¹⁵ 0557 Human Anti-D (Rh₀) Immunoglobulin. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

¹⁶ 1527 Human Anti-D (Rh₀) Immunoglobulin for Intravenous administration. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

¹⁷ 0769 Human Hepatitis A Immunoglobulin. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

¹⁸ 0722 Human Hepatitis B Immunoglobulin. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

1016 Human Hepatitis B Immunoglobulin for Intravenous administration. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

0722 Human Rabies Immunoglobulin. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

0398 Human Tetanus Immunoglobulin. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

0617 Human Rubella Immunoglobulin. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

0724 Human Varicella Immunoglobulin. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

1528 Human Varicella Immunoglobulin for Intravenous administration. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

0397 Human Measles Immunoglobulin. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

¹⁹ Human normal immunoglobulinum. Indian Pharmacopoeia V.IV; 2022.

²⁰ Human normal immunoglobulinum for intravenous. Indian Pharmacopoeia V.IV; 2022.

²¹ Anti-D (Rh₀) Immunoglobulin. Indian Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Anti-D (Rh₀) Immunoglobulin for intravenous use. Indian Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Hepatitis B Immunoglobulin. Indian Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Rabies Immunoglobulin. Indian Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Tetanus Immunoglobulin. Indian Pharmacopoeia V.IV; 2022.

«Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения»²², «Иммуноглобулин человека нормальный для внутримышечного введения»²³ и «Иммуноглобулин человека нормальный для подкожного введения»²⁴, которые гармонизированы с монографиями Ph. Eur. На ЛП ИГЧ в ВР представлено 11 монографий²⁵.

Китайская фармакопея

В Китайскую фармакопею включены общие монографии «Иммуноглобулин человека»²⁶ и «Иммуноглобулин человека, лиофилизированный»²⁷, которые распространяются на ЛП ИГЧ в ЛФ раствор и лиофилизат соответственно. По способу применения представлены 2 монографии на иммуноглобулин человека

нормальный для внутривенного введения, одна из которых распространяется на ЛП ИГЧ в ЛФ раствор, другая — на ЛП в ЛФ лиофилизат²⁸. На специфические ИГЧ включено 8 частных монографий²⁹.

Фармакопея США

В настоящее время в Фармакопее США (USP)³⁰ отсутствуют монографии на ЛП ИГЧ. В период с 2013 по 2021 г. в USP были включены следующие монографии: «Иммуноглобулин против гепатита В», «Иммуноглобулин против ветряной оспы и опоясывающего лишая», «Иммуноглобулин коклюшный» и «Иммуноглобулин».

Обеспеченность стандартами качества по количеству на ЛП ИГЧ в зарубежных странах приведена в *таблице 1*.

Таблица 1. Стандарты качества на лекарственные препараты иммуноглобулинов в региональных национальных фармакопеях

Table 1. Quality standards for immunoglobulin medicinal products in regional and national pharmacopoeias

Наименование образцов стандартов <i>Name of standard samples</i>	Европейская фармакопея <i>European Pharmacopoeia</i>	Британская фармакопея <i>British Pharmacopoeia</i>	Индийская фармакопея <i>Indian Pharmacopoeia</i>	Китайская фармакопея <i>China Pharmacopoeia</i>
Иммуноглобулины человека <i>Human immunoglobulins</i>	Нет <i>No</i>	Нет <i>No</i>	Нет <i>No</i>	2
Иммуноглобулины человека нормальные <i>Human normal immunoglobulins</i>	3	3	2	2
Иммуноглобулины человека специфические <i>Human specific immunoglobulins</i>	11	11	5	8

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

²² Normal immunoglobulinum for intravenous use. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

²³ Normal immunoglobulinum for intramuscular administration. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

²⁴ Normal immunoglobulinum for subcutaneous administration. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

²⁵ Anti-D (Rh₀) Immunoglobulin. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Anti-D (Rh₀) Immunoglobulin for intravenous use. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Hepatitis B Immunoglobulin. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Hepatitis B Immunoglobulin for Intravenous use. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Hepatitis A Immunoglobulin. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Rabies Immunoglobulin. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Tetanus Immunoglobulin. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Rubella Immunoglobulin. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Varicella Immunoglobulin. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Varicella Immunoglobulin for Intravenous use. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

Measles Immunoglobulin. British Pharmacopoeia V.IV; 2022.

²⁶ Human immunoglobulinum. China Pharmacopoeia V.III; 2020.

²⁷ Human immunoglobulinum, Freeze-dried. China Pharmacopoeia V.III; 2020.

²⁸ Human immunoglobulinum (pH4) for intravenous injection. China Pharmacopoeia V.III; 2020.

Human immunoglobulinum (pH4) for intravenous injection, Freeze-dried. China Pharmacopoeia V.III; 2020.

²⁹ Human Hepatitis B Immunoglobulin. China Pharmacopoeia V.IV; 2020.

Human Hepatitis B Immunoglobulin, Freeze-dried. China Pharmacopoeia V.IV; 2020.

Human Hepatitis B (pH4) for intravenous injection, Freeze-dried. China Pharmacopoeia V.IV; 2020.

Human immunoglobulinum (pH4) for intravenous injection, Freeze-dried. China Pharmacopoeia V.III; 2020.

Human Rabies Immunoglobulin. China Pharmacopoeia V.IV; 2020.

Human Rabies Immunoglobulin, Freeze-dried. China Pharmacopoeia V.IV; 2020.

Human Tetanus Immunoglobulin. China Pharmacopoeia V.IV; 2020.

Human Tetanus Immunoglobulin, Freeze-dried. China Pharmacopoeia V.IV; 2020.

³⁰ <https://online.uspnf.com/uspnf>

Анализ стандартов качества на лекарственные препараты иммуноглобулинов человека в Российской Федерации

Требования к показателям качества на ЛП ИГЧ и методики их испытаний изложены в ГФ РФ в виде ОФС и ФС. В нашей стране первыми стандартами качества на ЛП ИГЧ были ФС 42-79ВС-87³¹ и ФС 42-232ВС-88³².

В свое время это был существенный шаг вперед в деле формирования стандартов качества для препаратов ИГЧ российского производства с учетом особенностей этой группы ЛС. В 1995 г. были утверждены ФС 42-3198-95³³ и ФС 42-3159-95³⁴ взамен указанным выше. Более того, спецификация на ИГЧ в Российской Федерации была отражена в отраслевом стандарте ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения», утвержденном приказом Минздрава России³⁵. В указанном документе в Приложении № 2 приводится перечень разделов ФС и ФС на ЛС конкретных предприятий — производителей ЛС на ЛП ИГЧ. Документ был более приближен к международным стандартам, но не предусматривал контроля ЛП ИГЧ по содержанию анти-А и анти-В гемагглютининов и активатора прекалликреина.

В рамках ГФ РФ ОФС и ФС на ЛП ИГЧ впервые были утверждены приказом Минздрава России³⁶ как ОФС.1.8.1.0003.15³⁷ (вводится впервые), ФС.3.3.2.0008.15³⁸ и ФС.3.3.2.0007.15³⁹. Эти

фармакопейные статьи (ОФС и ФС) были включены в ГФ РФ XIII издания. Первостепенное внимание было уделено совершенствованию контроля качества ЛП ИГЧ, что нашло свое дальнейшее развитие в последующих изданиях фармакопеи.

В настоящее время действующими являются: ОФС.1.8.1.0003.15⁴⁰, ФС.3.3.2.0008.15⁴¹ и ФС.3.3.2.0007.15⁴² и 6 ФС на ЛП ИГЧ специфические⁴³. Несмотря на то, что эти стандарты качества включают более совершенные подходы к оценке качества ЛП ИГЧ, российские фармакопейные требования отличаются от принятых в международной практике.

Очевидно, что для обеспечения качества, эффективности и безопасности ЛС необходимо следовать единым стандартам. Следовательно, существует необходимость анализа ведущих зарубежных фармакопей, в первую очередь Ph. Eur., с целью гармонизации с ГФ РФ подходов к подтверждению качества ЛП ИГЧ.

Сравнительный анализ фармакопейных требований к качеству ЛП ИГЧ в Государственной фармакопее Российской Федерации и Европейской фармакопее

Учитывая современные тенденции гармонизации национальных фармакопейных требований с региональными, проведен анализ фармакопейных требований к показателям качества ЛП ИГЧ Российской (ГФ РФ XIV) и Европейской фармакопей (табл. S1, опубликована на сайте журнала⁴⁴). Проведенный анализ российских

³¹ ФС 42-79ВС-87 Иммуноглобулин человека нормальный. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. М.; 2008.

³² ФС 42-232ВС-88 Иммуноглобулин нормальный человеческий для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. М.; 2008.

³³ ФС 42-3198-95 Иммуноглобулин человека нормальный. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. М.; 2008.

³⁴ ФС 42-3159-95 Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. М.; 2008.

³⁵ Приказ Минздрава России от 01.11.2001 № 388 «О государственных стандартах качества лекарственных средств».

³⁶ Приказ Минздрава России от 21.11.2014 № 768 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей».

³⁷ ОФС.1.8.1.0003.15 Иммуноглобулины человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. М.; 2015.

³⁸ ФС.3.3.2.0008.15 Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. М.; 2015.

³⁹ ФС.3.3.2.0007.15 Иммуноглобулин человека нормальный. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. М.; 2015.

⁴⁰ ОФС.1.8.1.0003.15 Иммуноглобулины человека. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

⁴¹ ФС.3.3.2.0008.15 Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁴² ФС.3.3.2.0007.15 Иммуноглобулин человека нормальный. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁴³ ФС.3.3.2.0009.18 Иммуноглобулин человека противостафилококковый. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ФС.3.3.2.0010.18 Иммуноглобулин человека противостолбнячный. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ФС.3.3.2.0011.18 Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ФС.3.3.2.0012.18 Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутримышечного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ФС.3.3.2.0013.18 Иммуноглобулин человека противоаллергический. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

ФС.3.3.1.0039.15 Иммуноглобулин человека противооспенный раствор, для внутримышечного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁴⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-296-306-table-s1>

стандартов качества выявил несоответствие по очень важным показателям качества и, следовательно, необходимость гармонизации российских стандартов качества ЛП ИГЧ с международными требованиями по некоторым из них, а также в части совершенствования подходов к обеспечению их качества и унификации методов контроля. Показано, что ГФ РФ не регламентирует для ЛП ИГЧ такие показатели качества, как активатор прекалликреина, антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В, иммуноглобулин А (для иммуноглобулина человека нормального для внутримышечного и подкожного введения), антитела к вирусу гепатита А (для иммуноглобулина человека нормального для внутримышечного введения). Методики определения показателей «Белок», «Электрофоретическая однородность», «Молекулярные параметры» нуждаются в оптимизации и стандартизации.

Совершенствование национальных фармакопейных стандартов качества на лекарственные препараты иммуноглобулинов человека

Методология создания проектов ОФС и ФС

На основе проведенного анализа фармакопейных требований к качеству ЛП ИГЧ подготовлены проекты ОФС «Иммуноглобулины человека» и 3 ФС на ЛП ИГЧ нормальных по способу применения. В проектах ФС на ЛП ИГЧ нормальных по способу применения отмечается, что ЛП должен отвечать требованиям, которые приведены в ОФС «Иммуноглобулины человека» (если применимо), а также требованиям, указанным в самой ФС (показатели качества с указанием нормативных требований). При подготовке проекта ОФС «Иммуноглобулины человека», который содержит общую информацию, нами была выбрана стратегия по трем направлениям. В проект включены требования, применимые ко всем ЛП ИГЧ нормальных; требования к ЛП ИГЧ нормальных в зависимости от способа введения и лекарственной формы, а также включено описание методов испытаний по показателям «Белок», «Электрофоретическая однородность», «Молекулярные параметры».

Структура фармакопейных стандартов

Структура ОФС «Иммуноглобулины человека» состоит из следующих разделов: «Определение», «Производство» (особенности технологии), «Лекарственный препарат» (свойства, идентификация, испытания, количественное определение), далее следуют разделы «Хранение» и «Маркировка».

В отличие от действующей ОФС «Иммуноглобулины человека» в раздел «Производство» проекта ОФС внесено уточнение, что для получения препаратов ИГЧ «производство должно быть валидировано с целью подтверждения стабильности произведенных серий, сопоставимых с сериями, имеющими доказанную клиническую эффективность и безопасность. Стабильность ЛП ИГЧ должна быть подтверждена соответствующими испытаниями, проведенными при фармацевтической разработке».

В разработанных проектах ФС на ИГЧ нормальный для внутривенного и подкожного введения предусмотрено, что методы выделения фракции IgG должны обеспечивать получение ЛП, который будет безопасен в отношении передачи гемотрансмиссивных инфекций и не будет проявлять тромбогенной (прокоагулянтной) активности.

Общие требования на ЛП ИГЧ нормальных приведены для следующих показателей: «Видимые механические включения» и «Идентификация». Следует отметить, что предусмотрено проведение испытаний по показателям вирусной безопасности при соответствующем обосновании на этапах производства на готовом нерасфасованном продукте (при подтверждении, что последующий производственный процесс не влияет на качество ЛП по этим показателям), а в разделе «Испытания» эти показатели не предусмотрены.

В проекте были структурированы требования к показателям качества ЛП ИГЧ нормальных, выделив показатели по способу применения. Так, например, ЛП ИГЧ нормального для внутривенного введения должны подвергаться обязательному контролю качества по показателям «Антикомплемментарная активность», «Активатор прекалликреина» и «Осмоляльность».

ЛП ИГЧ нормального для внутривенного и подкожного введения должны отвечать требованиям по показателю «Анти-А и анти-В гемагглютинины», а препараты для внутривенного и подкожного введения (кроме иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D)) — по показателю «Анти-D антитела».

В подготовленном проекте ОФС «Иммуноглобулины человека» в соответствующих случаях показатели качества приведены с уточнением, для каких ЛФ применим тот или иной показатель. Например, ЛП в жидкой ЛФ должны контролироваться по показателю «Извлекаемый объем»; препараты в ЛФ лиофилизаты — по показателю «Вода» или «Потеря в массе при сушивании»; ЛП ИГЧ для парентерального применения — по показателям «Стерильность»,

«Пирогенность» или «Бактериальные эндотоксины» и «Иммуноглобулин А».

Раздел «Описание» предусмотрен для всех фармакопейных статей на ЛП ИГЧ и содержит нормативные требования в зависимости от ЛФ (раствор или лиофилизат).

Подлинность ЛП — один из основных показателей их качества. В действующих ОФС и ФС ГФ РФ на иммуноглобулины человека подлинность (видоспецифичность) подтверждается наличием белков только сыворотки крови человека методом иммунодиффузии в геле и наличием основного компонента IgG методом иммуноэлектрофореза. Однако используемый ранее подход к подтверждению подлинности основывался на установлении видоспецифичности. В то же время начиная с 2019 г. подлинность плазмы человека для фракционирования, используемую для производства ЛП ИГЧ в соответствии с действующей ФС.3.3.2.0001.19⁴⁵, подтверждают наличием прослеживаемости доноров (документально). По этой причине в подготовленном проекте ОФС «Иммуноглобулины человека» в разделе «Идентификация» предусмотрен метод иммуноэлектрофореза, с помощью которого подлинность подтверждают наличием основного компонента, соответствующего IgG сыворотки крови человека.

Спектр показателей качества

В разделе «Испытания» в зарубежных фармакопеях и в ГФ РФ приводятся показатели качества, а также ссылки на ОФС, в которых подробно изложены методы испытаний. К показателям качества, для оценки которых предусмотрены фармакопейные методики, относятся: «Белок», «Электрофоретическая однородность» и «Молекулярные параметры». Проблемный аспект гармонизации методологических подходов к оценке этих показателей заключается в различиях методик, приведенных в ГФ РФ и Ph. Eur., и подходов к их метрологическому обеспечению. Методологические подходы к стандартизации ЛП ИГЧ по вышеуказанным показателям должны быть направлены на стандартизацию методик и разработку доступных национальных стандартных образцов [12].

В соответствии с действующей ОФС «Иммуноглобулины человека» ГФ РФ определение показателя «Белок» предусмотрено только колориметрическим методом с биуретовым реактивом. Методика предполагает использование стандартного образца, аттестованная

характеристика которого представлена в виде номинальной величины, позволяющей проводить расчет количественного содержания белка в испытуемом образце относительно стандартного [12]. Однако мировой подход основан на использовании прямого определения белка. В рамках гармонизации с Ph. Eur. в проекте ОФС «Иммуноглобулины человека» предусмотрен метод определения белка с помощью минерализации серной кислотой с последующим расчетом количественного содержания белка по массовой доле азота (метод Кьельдаля). В проекте есть указание на допустимость проведения испытания биуретовым методом в соответствии с ОФС «Определение белка», метод 5 (колориметрический метод с биуретовым реактивом)⁴⁶.

Согласно Ph. Eur. электрофоретическую однородность определяют методом зонального электрофореза, где в качестве носителя могут быть использованы подходящие пленки из ацетата целлюлозы или агарозного геля. Если в качестве носителя используют ацетат целлюлозу, испытание может быть проведено методикой, описанной в монографиях. Если используют агарозные гели, являющиеся частью автоматизированной системы, то следуют инструкциям производителя. В отличие от Ph. Eur. в ГФ РФ в качестве носителя применяют пленки из ацетата целлюлозы. В качестве контрольного раствора предусмотрено использование реагента нормальной сыворотки крови человека. При этом требование к окончанию процесса электрофореза другое и заключается в идентификации полосы альбумина на расстоянии не менее 30 мм от линии старта. Кроме того, в Ph. Eur. в качестве раствора сравнения предусмотрено использование ФСО иммуноглобулина человека для электрофореза (Human immunoglobulin for electrophoresis, biological reference preparation (BRP) H1000000, EDQM). Различия в методике могут быть также связаны с конкретной моделью используемого оборудования. Методика определения однородности ЛП ИГЧ в подготовленном проекте ОФС «Иммуноглобулины человека» гармонизирована с Ph. Eur.

Следует отметить, что требования к содержанию примесных белков приводятся в проектах ФС на иммуноглобулины человека (для внутривенного, внутримышечного и подкожного введения), где дана ссылка на ОФС «Иммуноглобулины человека».

Показатель «Молекулярные параметры» в препаратах ИГЧ для парентерального применения

⁴⁵ ФС.3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁴⁶ ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

контролируется при оценке молекулярно-массового распределения белков. В Ph. Eur. этот показатель контролируют методом эксклюзионной хроматографии. В разделе «Молекулярные параметры» описано приготовление испытуемого раствора, раствора сравнения, подвижной фазы, приведены условия хроматографического разделения. В качестве раствора сравнения предусмотрено использование ФСО иммуноглобулина человека (молекулярные параметры). В рамках гармонизации с Ph. Eur. в подготовленном проекте ОФС «Иммуноглобулины человека» контроль показателя «Молекулярные параметры» предусмотрен методом эксклюзионной хроматографии, заменившей метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в действующей ОФС.

С целью гармонизации с мировыми стандартами качества необходима разработка и аттестация ФСО для определения молекулярных параметров иммуноглобулинов. Нормативные требования по содержанию мономера IgG и его димерной формы, а также высокомолекулярных компонентов — полимеров и агрегатов гармонизированы в ГФ РФ с Ph. Eur. и указаны в проектах ФС. В них приведена ссылка на ОФС «Иммуноглобулины человека», в которой подробно изложена сама методика.

Анализ международных требований позволил установить необходимость создания современных методологических подходов к стандартизации и контролю качества ЛП ИГЧ российского производства. Гармонизация фармакопейных требований ГФ РФ с международными требова-

ниями должна осуществляться путем унификации перечня показателей качества и методов их оценки.

Наличие ФСО, аналогичных образцу BRP, позволит унифицировать условия учета приемлемости результатов испытания. Подготовленные проекты ОФС «Иммуноглобулины человека» и ФС на ЛП ИГЧ нормальных по способу применения гармонизированы с мировыми стандартами качества и отражают современный уровень фармакопейной стандартизации ЛП ИГЧ. Проекты ОФС и ФС на ЛП ИГЧ утверждены на заседании Совета Минздрава России по Государственной фармакопее и будут включены в приложение ГФ РФ XV издания.

ВЫВОДЫ

1. Результаты сравнительного анализа фармакопейных требований указали на необходимость гармонизации российских стандартов качества ЛП ИГЧ с фармакопеями ведущих стран мира, в первую очередь с Европейской фармакопеей.
2. На основе проведенного анализа фармакопейных требований к показателям качества ЛП ИГЧ подготовлены проекты фармакопейных статей для ГФ РФ XV издания в соответствии с современными принципами гармонизации национальных фармакопейных требований с региональными.
3. Для дальнейшей стандартизации методик определения отдельных показателей качества ЛП ИГЧ требуется разработка фармакопейных стандартных образцов.

Литература/References

1. Wilson BE, Freman CM. Immunoglobulin therapy for immunodeficiency. *Allergy Asthma Proc.* 2024;45(5):364–70. <https://doi.org/10.2500/aap.2024.45.240053>
2. Мухина АА, Абрамова ИН, Кузьменко НБ и др. Заместительная терапия препаратами иммуноглобулинов у пациентов с первичными иммунодефицитами в Российской Федерации. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2020;19(4):18–29. Mukhina AA, Abramova IN, Kuzmina NB, et al. Immunoglobulin replacement therapy in patients with primary immunodeficiency diseases in Russia. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology.* 2020;19(4):18–29 (In Russ.). <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2020-19-4suppl-18-29>
3. Gröning R, Walde J, Ahlm C, et al. Intravenous immunoglobulin therapy for COVID-19 in immunocompromised patients: A retrospective cohort study. *Int J Infect Dis.* 2024;144:107046. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2024.107046>
4. Farrugia A, Bansal M, Marjanovic I. Estimation of the latent therapeutic demand for immunoglobulin therapies in autoimmune neuropathies in the United States. *Vox Sang.* 2021;117(2):208–19. <https://doi.org/10.1111/vox.13134>
5. Васильев ЧЛ, Старкина ОВ. Иммуноглобулины человека как иммуномодулирующие препараты. *Молекулярная биология.* 2019;53(5):860–70. Vasiliev TL, Starkina OV. Pooled human immunoglobulin preparations as immunomodulating drugs. *Mol Biol.* 2019;53(5):758–66. <https://doi.org/10.1134/S002689841905015X>
6. Зубкова НВ. Биотехнологические аспекты эффективной и безопасной переработки донорской плазмы: проблемы и перспективы. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2014;1(49):4–10. Zubkova NV. Biotechnological aspects of effective and safe processing of donor plasma: problems and prospects. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2014;1(4):4–10 (In Russ.). EDN: [SSXZEB](https://doi.org/10.1134/S002689841905015X)
7. Ghorbani J, Kompany-Zareh M, Tahmasebi E. Antibodies purification from human plasma using fractionation, chromatography and gel electrophoreses assisted by multivariate analysis of complimentary absorption and fluorescence spectra. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2021;1167:122526. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122526>

8. Орлова ЕС, Чепанов СВ, Зайнулина МС, Сельков СА. Клинико-иммунологическое обоснование протокола использования плазмафереза и внутривенных иммуноглобулинов у беременных с антифосфолипидным синдромом. *Медицинская иммунология*. 2025;27(1):35–44. Orlova ES, Chepanov SV, Zainulina MS, Selkov SA. Clinical and immunological substantiation of the protocol for the use of plasmapheresis and intravenous immunoglobulins in pregnant women with antiphospholipid syndrome. *Medical Immunology (Russia)*. 2025;27(1):35–44 (In Russ.). <https://doi.org/10.15789/1563-0625-UOP-2893>
9. Вахляевская СС, Костылева МН, Боткина АС и др. Практические аспекты применения внутривенных иммуноглобулинов для введения при различной патологии. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2021;100(2):174–81. Vakhlayrskaya SS, Kostyleva MN, Botkina AS, et al. Practical aspects of the application of intravenous immunoglobulins for intravenous administration in various pathologies. *Pediatrics n.a. G.N. Speransky*. 2021;100(2):174–81 (In Russ.). EDN: IFYDNG
10. Яруткин АВ, Багирова ВЛ. Государственная фармакопея XV издания: приоритетные направления развития. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(5):572–9. Yarutkin AV, Bagirova VL. State Pharmacopoeia of the Russian Federation edition XV: development priorities. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(5):572–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-572-579>
11. Корнилова ОГ, Багирова ВЛ. Фармакопейная стандартизация биологических лекарственных препаратов: основные принципы в условиях единого фармацевтического рынка. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(1):71–82. Kornilova OG, Bagirova VL. Pharmacopoeial standardisation of biological medicinal products: Basic principles for the common pharmaceutical market of the Eurasian Economic Union. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(1):72–82 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-1-71-82>
12. Устинникова ОБ, Щербаченко ИМ, Колесникова ОН и др. Перспективные вопросы оценки физико-химических показателей качества иммунобиологических лекарственных препаратов в условиях формирования регуляторной системы ЕАЭС. *Биомедицина*. 2024;20(3Е):117–28. Ustinnikova OB, Shcherbachenko IM, Kolesnikova ON, et al. Issues of physicochemical quality assessment of immunobiological medicinal products in the context of formation of a regulatory system in the Eurasian Economic Union. *Journal Biomed*. 2024;20(3E):117–28 (In Russ.). <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-117-128>

Дополнительная информация. На сайте журнала «Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликована таблица S1.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-296-306-table-s1>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **О.А. Демидова** — написание текста рукописи, формулировка выводов; **О.Г. Корнилова** — концепция работы, редактирование и критический пересмотр текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **В.Л. Багирова** — утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Additional information. Table S1 is published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-296-306-table-s1>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows: **O.A. Demidova** drafted the manuscript, formulated the conclusions; **O.G. Kornilova** conceptualised the work, critically revised and edited the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication; **V.L. Bagirova** approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Демидова Ольга Александровна, канд. фарм. наук / **Olga A. Demidova**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0123-3044>

Корнилова Ольга Геннадьевна, д-р фарм. наук / **Olga G. Kornilova**, Dr. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1439-2052>

Багирова Валерия Леонидовна, д-р фарм. наук, проф. / **Valeria L. Bagirova**, Dr. Sci. (Pharm.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0379-6158>

Поступила 12.03.2025

После доработки 31.07.2025

Принята к публикации 12.09.2025

Received 12 March 2025

Revised 31 July 2025

Accepted 12 September 2025



Вспомогательные вещества в составе биологических лекарственных препаратов: функциональная классификация, проблемы стабильности, аналитические подходы к определению

А.С. Минеро[✉], О.Б. Рунова, И.М. Щербаченко, О.Б. Устинникова

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

✉ Минеро Анастасия Сальвадоровна; minero@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Потенциальное нежелательное действие вспомогательных веществ (ВВ) биологических лекарственных препаратов (БЛП) и сложности их аналитического контроля представляют значительную проблему при разработке и экспертизе лекарственных средств. Современные аналитические методы и инновационные подходы к подбору ВВ позволяют минимизировать риски и усовершенствовать контроль качества БЛП.

ЦЕЛЬ. Анализ современных методов количественного определения вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах и оценка перспектив их применения для совершенствования лабораторной экспертизы при регистрации и подтверждения соответствия качества препаратов при вводе в гражданский оборот.

ОБСУЖДЕНИЕ. Поиск литературы проводился с использованием баз данных SciFinder, PubMed, eLIBRARY.RU. Представлены данные о функциональной классификации ВВ. Проведен анализ потенциального нежелательного действия ВВ: риск сахарозной нефропатии при применении внутривенных препаратов иммуноглобулинов, содержащих сахарозу; гипогликемия, изменение метаболизма аминокислот, снижение синтеза нуклеиновых кислот и угнетение функциональной активности тромбоцитов вследствие высокой концентрации натрия каприлата в препаратах альбумина. Важным аспектом оценки безопасности использования ВВ является изучение продуктов их деградации. Представлены данные о путях решения проблем, связанных с деградацией ВВ, включая снижение содержания или замену ВВ, как в случае с натрием каприлатом, которые многие производители исключают из состава рецептур БЛП. Рассмотрены инновационные подходы к поиску новых адъювантов (MF59, AS01, AS03, AS04, RC-529), совмещающих функции индукторов иммунного ответа и систем доставки. Представлены данные об использовании математического моделирования при выборе состава композиции ВВ. Проведен анализ современных аналитических методов количественного определения ВВ, включая жидкостную и газофазную хроматографию, спектрофотометрические методы для количественной оценки наиболее значимых ВВ в БЛП (аминокислоты, полисорбаты, фенол, феноксизтанол, бензиловый спирт, натрия каприлат). Рассмотрены перспективные методики, такие как эксклюзионная ВЭЖХ для оценки полисорбата 80, HILIC ВЭЖХ для селективного количественного определения аминокислот в составе композиции, гидрофильная ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием и ионообменная ВЭЖХ с амперометрическим детектированием для анализа стабилизаторов углеводной природы (сорбит, маннит, трегалоза, глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза), а также газофазная хроматография для идентификации и количественной оценки 2-феноксизтанола и м-крезола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Выбор ВВ для БЛП представляет собой комплексную задачу, требующую разработки стратегии контроля не только установленных норм их содержания, но и воз-

можных продуктов деградации. Разработка унифицированных аналитических методов для количественного определения ВВ является основным направлением для обеспечения качества БЛП на этапах регистрационной экспертизы и ввода в гражданский оборот.

Ключевые слова: вспомогательные вещества; биологические лекарственные препараты; функциональная классификация; стабильность; деградация; высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭЖХ; консерванты; стабилизаторы; адъюванты; контроль качества

Для цитирования: Минеро А.С., Рунова О.Б., Щербаченко И.М., Устинникова О.Б. Вспомогательные вещества в составе биологических лекарственных препаратов: функциональная классификация, проблемы стабильности, аналитические подходы к определению. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):307–320. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-307-320>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Excipients in biological medicinal products: Functional classification, stability issues, and analytical quantitation approaches

Anastasia S. Minero✉, Olga B. Rounova, Irina M. Shcherbachenko,
Olga B. Ustinnikova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Anastasia S. Minero; minero@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. When developing and evaluating new biological products (BP), potential adverse action and complicated analytical procedure are a specific issue. Innovative analytical methods and selection of excipients allow for risk minimisation and enhanced quality control of biological products.

AIM. This study aimed to analyse modern quantitative approaches to BP excipients and assess their prospects in improving laboratory expertise during authorisation and quality compliance testing of a biological product that has been launched into the commercial market.

DISCUSSION. The literature search was performed using SciFinder, PubMed, and eLIBRARY.RU databases. The authors showed data on functional classification of the excipients. Potential adverse effects were analysed, including sucrose nephropathy when using intravenous immunoglobulin preparations containing sucrose; hypoglycaemia; changes in amino acid metabolism; decreased DNA and RNA synthesis, and inhibition of platelet function caused by elevated sodium caprylate in albumin preparations. Analysed methods are based on excipient degradation. Possible solutions have been described (reduction or replacement with another excipient, such as sodium caprylate excluded from the BPs of many manufacturers). Innovative search approaches were used for new adjuvants (MF59, AS01, AS03, AS04, and RC-529) combining immune response inducers and delivery systems. The described mathematical model was used to select excipient composition. The authors analysed literature covering analytical methods for excipient quantitation, including liquid and gas-liquid chromatography and spectrophotometric quantitation methods of the most significant excipients in BPs (amino acids, polysorbates, phenol, phenoxyethanol, benzyl alcohol, and sodium caprylate). Prospects of different analytical techniques were considered (size-exclusion HPLC for evaluation of polysorbate 80, HILIC HPLC for selective quantitation of amino acid components, hydrophilic HPLC with refractometric detection and ion-exchange HPLC with amperometric detection for selective

quantitation of carbohydrate stabilisers (sorbitol, mannitol, trehalose, glucose, lactose, sucrose, maltose), as well as gas-liquid chromatography for 2-phenoxyethanol and m-cresol.

CONCLUSIONS. Selecting BP excipients is a complex task that requires a control strategy not only for established concentrations, but also for products of possible degradation. Developing unified analytical methods for excipient quantitation is a priority for quality assurance of BPs authorised and launched into the commercial market.

Keywords: excipients; biological products; functional classification; stability; degradation; high performance liquid chromatography; HPLC; preservatives; stabilisers; adjuvants; quality control

For citation: Minero A.S., Rounova O.B., Shcherbachenko I.M., Ustinnikova O.B. Excipients in biological medicinal products: Functional classification, stability issues, and analytical quantitation approaches. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):307–320. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-307-320>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

На рубеже 2000-х гг. произошли значительные изменения в подходах к изучению вспомогательных веществ (ВВ) лекарственных препаратов. В настоящее время исследование их влияния на безопасность и эффективность препаратов представляет собой самостоятельное направление фармацевтической науки [1].

ВВ являются критически важным компонентом лекарственных препаратов, обеспечивающим их механические, физико-химические и биофармацевтические характеристики. Особое значение их состав и концентрация приобретают в биологических лекарственных препаратах (БЛП), где сложная и лабильная природа действующего вещества (белки, нуклеиновые кислоты и др.) обуславливает высокую чувствительность к составу ВВ. Эти вещества играют ключевую роль в поддержании стабильности препаратов, предотвращая агрегацию, сорбцию на поверхности первичной упаковки, окисление и другие пути деградации, что в конечном итоге определяет терапевтическую эффективность и безопасность БЛП.

Актуальность исследования определяется острой необходимостью разработки надежных подходов к количественной оценке ВВ в БЛП. Основная сложность заключается в количественном определении ВВ в составе готовой лекарственной формы БЛП с учетом широкой номенклатуры ВВ, включающей стабилизаторы, буферные системы, поверхностно-активные вещества (ПАВ), антиоксиданты, антимикробные консерванты, регуляторы кислотности, что требует разработки высокочувствительных и селективных методик для каждого химического класса веществ [2]. Существенные трудности создает

отсутствие унифицированных валидированных методик, а также матричные эффекты, обусловленные присутствием высокомолекулярного действующего вещества, других ВВ и продуктов деградации. Эти факторы значительно осложняют оценку качества БЛП при проведении лабораторной фармацевтической экспертизы в процессе регистрации и подтверждения качества при вводе препаратов в гражданский оборот.

Цель работы — анализ современных методов количественного определения вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах и оценка перспектив их применения для совершенствования лабораторной экспертизы при регистрации и подтверждения соответствия качества препаратов при вводе в гражданский оборот.

Поиск информации проводили с использованием баз данных SciFinder, PubMed, eLIBRARY.RU по ключевым словам на русском и английском языках: «вспомогательные вещества», «биологические лекарственные препараты», «стабилизаторы», «белки», «аминокислоты», «поверхностно-активные вещества», «солюбилизаторы», «лиофилизация», «фармакопея», «ВЭЖХ», «excipients», «biological products», «stabilizers», «proteins», «amino acids», «surfactants», «solubilizer», «lyophilisation», «pharmacopoeia», «HPLC» и др. Были проанализированы обзорные, оригинальные статьи, а также патенты, опубликованные в период с 2014 по 2024 гг.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Классификация вспомогательных веществ

В настоящее время в Российской Федерации и за рубежом придерживаются функциональной классификации ВВ¹, учитывающей различные

¹ United States Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF). USP and NF excipients, listed by functional category. USP; 2025.

функциональные роли одного и того же вещества. В зависимости от основной функции ВВ разделяют на более чем 40 функциональных классов. Установлено, что вариабельность состава ВВ в пределах одного функционального класса может существенно влиять на эффективность и профиль безопасности лекарственных средств даже в случае одинакового действующего вещества [3].

Список ВВ представлен в базах данных различных стран. В США Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) публикует справочник вспомогательных (неактивных) веществ² (Inactive Ingredient Database, IID). Японский совет по фармацевтическим ВВ (Japan Pharmaceutical Excipients Council) систематизирует данные о ВВ, способах их применения и влияния на пациентов, публикуя словарь фармацевтических ВВ (Japanese Pharmaceutical Excipients Directory, JPED). В странах Евразийского экономического союза применяется классификатор ВВ, используемых при производстве лекарственных средств³.

Свойства ВВ и требования к ним, включая физические характеристики, подлинность, химическую и микробиологическую чистоту, регламентированы в отдельных монографиях Европейской фармакопеи, а также в общей монографии Substances for pharmaceutical use⁴. В 2024 г. в Европейскую фармакопею включена монография Functionality-related characteristics of excipients⁵, имеющая рекомендательный статус, согласно которой информация о новых ВВ, помимо указания их функциональных характеристик, может содержать сведения о рекомендуемых методиках определения и установленном диапазоне количественного содержания.

В соответствии с руководством Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) Guideline on the chemistry of active substances⁶ для новых ВВ рекомендуется предоставить подробное описание процесса производства и очистки, физических и химических свойств, валидированные аналитические методики по оценке

подлинности, количественного определения, посторонних примесей, остаточных растворителей, данные по контролю стабильности⁷ и исследованиям безопасности и иммуногенности.

Функциональная роль вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах

Роль вспомогательных компонентов в БЛП, представляющих собой преимущественно растворы или лиофилизаты веществ белковой и/или полисахаридной природы, сводится к выполнению нескольких критически важных функций, баланс которых обеспечивает оптимальный профиль эффективности и безопасности готового продукта: 1) поддержание физико-химической стабильности действующего вещества; 2) модуляция иммуногенных свойств; 3) предотвращение микробной контаминации. Следует отметить, что роль конкретного ВВ редко ограничивается единственной функцией. Как правило, наблюдается комплексное воздействие как на действующее вещество, так и на его молекулярное окружение. При этом особую значимость приобретает вопрос стабильности белковых молекул. В естественных условиях белки сохраняют свою нативную структуру и функциональную активность благодаря сложному микроокружению, однако при выделении и помещении в буферные растворы они часто теряют стабильность. Понятие белковой стабильности включает несколько аспектов: 1) сохранение биологической активности; 2) устойчивость к различным видам денатурации (конформационные изменения, процессы агрегации и полимеризации, окислительная модификация, дезамидирование и др.).

Наиболее распространенные ВВ в БЛП, отнесенные по основному типу действия к определенным функциональным категориям⁸ (табл. 1), могут проявлять в составе конкретного БЛП дополнительные свойства.

Действие стабилизаторов, представленных в таблице 1, направлено преимущественно на предотвращение агрегации и денатурации белковых молекул, а также на сохранение их

² www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm

³ Евразийская экономическая комиссия. Классификатор вспомогательных веществ. https://portal.eaeunion.org/sites/odata/_layouts/15/portal.eec.registry.ui/directoryform.aspx?viewid=c930669b-d628-42e4-999a-06adf5c3609e&listid=0e3ead06-5475-466a-a340-6f69c01b5687&itemid=352#

⁴ 07/2025:2034 Substances for pharmaceutical use. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2008.

⁵ 07/2024:51500 Functionality-related characteristics of excipients (FRC). European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2008.

⁶ Guideline on the chemistry of active substances (EMA/321776/2024). EMA; 2024.

⁷ Guideline on excipients in the dossier for application for marketing authorisation of a medicinal product. (EMA/CHMP/QWP/396951/2006). EMA; 2008.

Guidance for Industry. Nonclinical studies for the safety evaluation of pharmaceutical excipients. FDA; 2005.

⁸ United States Pharmacopoeia and National Formulary (USP-NF). USP and NF excipients, listed by functional category. USP; 2025.

Таблица 1. Основные вспомогательные вещества, входящие в состав биологических лекарственных препаратов
Table 1. Typical excipients found in biological medicinal products

Функциональная категория <i>Functional category</i>	Наименование вспомогательного вещества <i>Name of excipient</i>
Буферные вещества <i>Buffering agents</i>	Натрия фосфат, калия фосфат, натрия сукцинат, натрия цитрат, натрия ацетат, гистидин, аланин, аргинин, лизин, лимонная кислота, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота <i>Sodium phosphate, potassium phosphate, sodium succinate, sodium citrate, sodium acetate, histidine, alanine, arginine, lysine, citric acid, aspartic acid, glutamic acid</i>
Поверхностно-активные вещества <i>Surfactants</i>	Полисорбат 80, полисорбат 20, поллоксамер 188, пальмитиновая кислота, натрия лаурил сульфат <i>Polysorbate 80, polysorbate 20, poloxamer 188, palmitic acid, sodium lauryl sulfate</i>
Крио- и лиопротекторы <i>Cryo- and lyoprotectors</i>	Сахароза, декстран 40, глицин, лактоза, маннит, трегалоза <i>Sucrose, dextran 40, glycine, lactose, mannitol, trehalose</i>
Изотонирующие агенты <i>Tonicity agents</i>	Декстроза, гуанидина гидрохлорид, магния хлорид, мальтоза, глюкоза, калия хлорид, натрия хлорид, сорбит, глицерин <i>Dextrose, guanidine hydrochloride, magnesium chloride, maltose, glucose, potassium chloride, sodium chloride, sorbite, glycerin</i>
Регуляторы pH <i>pH regulators</i>	Фосфорная кислота, натрия гидроксид, натрия бикарбонат, натрия карбонат <i>Phosphoric acid, sodium hydroxide, sodium bicarbonate, sodium carbonate</i>
Антимикробные консерванты <i>Antimicrobial preservatives</i>	Фенол, тиомерсал, бензиловый спирт, кальция хлорид, метакрезол, метилпарабен, пропилпарабен <i>Phenol, thimerosal, benzyl alcohol, calcium chloride, metacresol, methylparaben, propylparaben</i>
Стабилизаторы <i>Stabilisers</i>	Натрия каприлат, каприловая кислота, альбумин человека, протамин сульфат, цинк, глицин, аргинин, пролин, лизин, N-ацетил-DL-триптофан <i>Sodium caprylate, caprylic acid, human albumin, protamine sulfate, zinc, glycine, arginine, proline, lysine, N-acetyl-DL-tryptophan</i>
Солюбилизаторы <i>Solubilisers</i>	Полиэтиленгликоль 3350, полиэтиленгликоль 6000 <i>Polyethylene glycol 3350, polyethylene glycol 6000</i>
Антиоксиданты <i>Antioxidants</i>	Метионин, никотинамид <i>Methionine, nicotinamide</i>

Таблица составлена авторами с использованием данных USP⁹ и источников [9, 10] / The table is prepared by the authors using USP⁹ data and sources [9, 10]

нативной структуры. Для стабилизации белковых молекул в готовом БЛП, как правило, применяют композиции из нескольких ВВ. Так, например, крио- и лиопротекторы, изотонирующие агенты, а также антиоксиданты проявляют стабилизирующие свойства в отношении белковых растворов благодаря синергетическому эффекту совместимых растворенных компонентов в составе различных композиций [4, 5]. Данный эффект позволяет рассматривать композиции аминокислот, сахаров и/или полиолов в качестве альтернативы высокомолекулярному стабилизатору — человеческому сывороточному альбумину. Известно свойство аргинина стабилизировать белковые молекулы, подавляя их агрегацию в результате взаимодействия с боковыми цепями аминокислотных остатков [6]. Кроме того, аргинин влияет на температуру стеклования, изменяя кинетическую стабильности молекулы белка [7, 8].

ВВ углеводной природы, кроме перечисленных в таблице 1 функций, применяются

в качестве разбавителей и наполнителей, обеспечивающих необходимые физико-химические свойства, такие как твердость и распадаемость (например, маннит и сорбит) [11, 12]. Маннит и сорбит применяются в качестве наполнителей в основном для лиофилизированных форм моноклональных антител и вакцин, а также таблетированной лекарственной формы препаратов аллергенов. Лактоза используется в составе вакцин; мальтоза — в препаратах иммуноглобулина человека нормального, а также в составе некоторых генно-инженерных иммуносупрессивных препаратов. Сахароза входит в состав препаратов факторов свертываемости крови, моноклональных антител, пегилированных интерферонов, соматотропинов, иммунодепрессивных препаратов. Глюкоза присутствует в некоторых препаратах иммуноглобулина человека нормального, а трегалоза — в отдельных генно-инженерных препаратах. Перечисленные соединения могут присутствовать в БЛП в различных композициях.

⁹ United States Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF). USP and NF excipients, listed by functional category. USP; 2025.

Содержание углеводов соединений в готовых лекарственных формах варьирует в широком диапазоне, что определяется типом препарата и его дозировкой. Например, в препарате иммуносупрессивного моноклонального антитела базиликсимаба содержание сахарозы и маннита составляет 20 и 80 мг/флакон соответственно, тогда как действующего вещества — 20 мг/флакон. В другом иммуносупрессивном препарате белатацепте содержание сахарозы достигает 550 мг/флакон, а действующего вещества — 275 мг/флакон¹⁰. Следует отметить, что описанный ранее риск развития сахарозной нефропатии при применении внутривенных препаратов иммуноглобулина стимулировал поиск альтернативных стабилизаторов с крио- и лиопротекторными свойствами. Их использование в композиции позволило исключить или снизить содержание сахарозы в лиофилизированных формах [13, 14]. Добавление кристаллического маннита в рецептуры, содержащие сахарозу, уменьшает время восстановления лиофилизированных препаратов терапевтических белков, что, возможно, обусловлено изменением структуры лиофилизата — она приобретает частично кристаллическое состояние [15].

К числу значимых достижений последних лет относятся данные ЯМР-спектроскопии, демонстрирующие влияние модификаторов — глицерина, сорбита и глюкозы — на сокращение длины водородных связей в основной цепи белка [16]. Несмотря на незначительность изменений водородной связи, следует учитывать воздействие осмолитов на структуру белков и потенциально связанных с ней функций молекулы.

Несмотря на многолетнюю тенденцию к отказу от использования консервантов в БЛП, их применение в ряде случаев остается необходимым¹¹. Консерванты требуются в препаратах многодозовых форм выпуска, а также в препаратах, для которых проведение стерилизующей фильтрации невозможно и/или обнаружение контаминации затруднено из-за непрозрачности растворов и др. Наличие в составе БЛП сахаров и аминокислот также является фактором, повышающим риск роста микроорганизмов [17].

В качестве консервантов для большинства отечественных вакцин и анатоксинов традиционно используют тиомерсал в концентрации

от 30 до 120 мкг/мл, а также фенол для препаратов аллергенов и некоторых вакцин (например, полисахаридных) в концентрации от 1,5 до 4,0 мг/мл. Согласно данным L. Stroppel с соавт. [18], зарубежные производители чаще применяют (в порядке убывания частоты использования): м-крезол, бензиловый спирт, бензалкония хлорид, хлорбутанол, метилпарабен и 2-феноксэтанол. Авторы считают перспективным направлением использование в качестве альтернативных консервантов алкилгликозидов, демонстрирующих высокую антимикробную активность.

Бензиловый спирт сочетает свойства консерванта и стабилизатора. В производстве БЛП это соединение не имеет широкого применения и содержится лишь в отдельных препаратах (например, интерферон альфа-2а и его пегилированная форма) в концентрациях 9,0–11,0 мг/мл, что соответствует требованиям ВОЗ (допустимая суточная доза до 20 мг/кг при парентеральном применении)¹². В исследованиях показано влияние бензинового спирта на искажение результатов оценки аномальной токсичности, что поддерживает аргументацию в пользу отмены данного теста [19].

Важно отметить, что консерванты влияют на агрегацию белковых молекул. В ряде исследований показано дозозависимое дестабилизирующее действие фенола, 2-феноксэтанол, м-крезола и бензинового спирта [20–23].

Для исследования механизмов стабилизации белковых молекул различными ВВ в настоящее время широко применяют математические модели, в частности эмпирические фазовые диаграммы. Примером такого подхода является изучение агрегации рекомбинантного антигена возбудителя сибирской язвы, проведенное с помощью построения фазовой диаграммы изменения pH и температуры при определении мутности раствора методом флуоресцентного анализа для различных ВВ (трегалоза, сорбит, маннит, декстроза, натрия цитрат) [24]. Данный подход позволяет быстро и эффективно проводить скрининг ВВ [25–27].

Необходимость использования консервантов для многодозовых форм стимулировала поиск сорастворителей, уменьшающих нежелательный эффект консервантов. Было установлено,

¹⁰ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>

¹¹ ОФС.1.7.1.0001.15 Аллергены. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

Points to consider on the reduction, elimination or substitution of thiomersal in vaccines (CPMP/BWP/ 2517/00). EMA; 2001. Thimerosal and Vaccines. FDA; 2018

¹² <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/364703/9789240054646-eng.pdf?sequence=1>

что триметиламин-N-оксид эффективно подавляет агрегацию IgG, вызванную бензиловым спиртом [28]. В отдельных исследованиях показано дестабилизирующее действие м-крезола на вирусоподобные частицы на основе белков вируса папилломы человека, адсорбированные на геле гидроксида алюминия [29].

Аспекты безопасности вспомогательных веществ

Изучение механизма действия стабилизаторов белковых молекул и данные об их побочных эффектах послужили основанием для пересмотра традиционных составов некоторых БЛП с длительной практикой клинического применения. Так, для обеспечения температурной стабильности препаратов альбумина при пастеризации ранее традиционно использовали натрия каприлат (натриевая соль октановой кислоты) [30]. Однако исследования показали, что присутствие в препарате натрия каприлата в значительных концентрациях способно вызывать гипогликемию, изменение метаболизма аминокислот, снижение синтеза ДНК и РНК, угнетение функциональной активности тромбоцитов и др. [31, 32]. В связи с этим большинство зарубежных и часть отечественных производителей изменили состав препаратов альбумина, сократив содержание натрия каприлата и включив натриевую соль N-ацетил-DL-триптофана [33].

Важным аспектом оценки безопасности использования ВВ является изучение продуктов их деградации. Некоторые ВВ подвержены деградации при нарушении условий хранения. При этом образующиеся примеси, как правило, остаются вне зоны контроля, что может влиять на стабильность БЛП. Примером служат полисорбаты (полисорбат 80 и полисорбат 20) — широко применяемые неионогенные поверхностно-активные соединения благодаря способности снижать адсорбцию и самоассоциацию белковых молекул путем взаимодействия с их гидрофобными частями и конкурентной адсорбции [34]. Полисорбаты также способны эффективно инактивировать оболочечные вирусы, например, ксенотропный вирус лейкемии мышей и вирус псевдобешенства [31, 35]. Однако молекулы полисорбата могут подвергаться гидролизу и/или химическому распаду с образованием нежелательных продуктов деградации: эфиры жирных кислот, сорбитаны, изосорбиды, альдегиды, кетоны, кислоты, пероксиды, алканы и др. [36, 37]. Известны варианты ферментативного гидролиза сложноэфирной связи полисорбата липопротеинлипазами,

присутствующими в качестве технологической примеси среди остаточных белков клеточной линии CHO [38, 39].

Исследования показали, что при неправильном хранении глицерин может окисляться до соответствующих карбонильных соединений, образование которых было подтверждено методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [40]. Результаты стресс-тестов продемонстрировали снижение содержания терапевтического белка в БЛП, содержащих глицерин: 66,4% в составах с деградированным глицерином по сравнению с 95,8% в других составах после стресс-теста. Таким образом, можно сделать вывод о необходимости не только количественной оценки, но и анализа возможных структурных изменений ВВ при хранении, изучении стабильности в реальных или ускоренных условиях.

Современные подходы к применению вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах

Для усиления иммуногенности вакцинных препаратов традиционно используются адъюванты. На смену производным алюминия, доказавшим свою эффективность в составе вакцин (аттенуированные, инактивированные вирусные вакцины, конъюгированные полисахаридные вакцины и др.), приходят новые поколения адъювантов: AS04, содержащий адсорбированный MPL (3-O-дезацил-4'-монофосфорил липид A — детоксифицированный липополисахарид *Salmonella minnesota*), и RC-529, содержащий адсорбированный синтетический лиганд TLR4 (толл-подобный рецептор 4) [41, 42].

Особый интерес представляют адъюванты на основе водно-масляных эмульсий, состоящие, в отличие от масляных адъювантов первого поколения, из метаболизируемых масел: MF59 (сквален, полисорбат 80, сорбитан триолеат) [43], AS01 (комбинация MPL и сапонины) [44], AS03 (сквален, α -токоферол, полисорбат 80) [45, 46].

В Российской Федерации разрешены к применению иммуномодулятор-адъювант полиоксидоний (сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбокси)-1,4-этиленпиперазиния бромид) и адъювант совидон (сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона), которые входят в состав отечественных гриппозных вакцин; зарегистрированы вакцина и мультивакцина для профилактики коронавирусной инфекции, содержащие адъювант на основе сквалена,

и вакцина против вируса ветряной оспы, содержащая MPL¹³ [47, 48].

Современные тенденции в разработке БЛП связаны с созданием новых систем доставки. Разработка инновационных генотерапевтических ДНК- и РНК-содержащих препаратов основана на применении аденовирусных векторов или аденовирусных капсидов [49–51]. Для доставки мРНК применяют катионную наноземлю на основе MF59 и AS03, в которой для инкапсуляции мРНК использован катионный липид – 1,2-диолеил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP) [52].

Приведенные подходы демонстрируют важность подбора ВВ как части сбалансированной системы, в которой изменение состава (замена компонентов, изменение концентрации) может нарушить баланс и привести к снижению эффективности и безопасности БЛП.

Аналитические подходы к оценке вспомогательных веществ

В настоящее время для количественной оценки ВВ наиболее информативными, высокоселективными и относительно доступными являются хроматографические методы анализа. Данные методы обладают существенными преимуществами перед традиционными методами количественного химического анализа, такими как спектрофотометрия, колориметрия, титриметрия и др., что обуславливает их широкое применение. Следует отметить, что для ряда ВВ отсутствуют фармакопейные методики количественного определения, что требует разработки производителями так называемых «методик фирм» (in-house methods).

Хроматографическое определение полисорбата 80 осуществляется главным образом путем анализа продукта гидролиза – олеиновой кислоты. Для этого применяют метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) [53–56] или газовой хроматографии (ГХ) [57] с использованием следующих типов детекторов: ультрафиолетового детектора, детектора заряженного аэрозоля, детектора по светорассеянию, масс-спектрометрического детектора. Содержание олеиновой кислоты в полисорбате 80 разных производителей существенно варьирует – от 40 до 98%. Это ограничивает применимость данного метода в качестве основного способа количественного определения полисорбата 80 в составе большинства лекарственных средств, поскольку требуется использование полисорбата 80

именно той марки и партии, которая применялась при производстве серии препарата. Существуют другие подходы, основанные на анализе нативного полисорбата 80 путем его отделения от белков методами ОФ-ВЭЖХ в градиентном режиме или эксклюзионной ВЭЖХ на различных типах сорбентов [58–63].

Спектрофотометрические методы определения полисорбата 80, основанные на формировании комплекса полисорбата с солями кобальта [64–67], имеют ограниченное применение вследствие сложной пробоподготовки, относительно низкой воспроизводимости и недостаточной информативности результатов, поскольку не позволяют выявлять продукты деградации.

Определение аминокислот в составе БЛП продолжает оставаться сложной задачей. Это связано с высокой трудоемкостью методик, требующих проведения многоступенчатой пробоподготовки, включающей этапы элиминации высокомолекулярных компонентов, химической модификации аминокислот, разделения смеси и последующей идентификации.

Анализ аминокислот проводится с помощью различных хроматографических методов: ионообменная ВЭЖХ [68], ОФ-ВЭЖХ [69–72], ГХ [73]. Эти методы включают стадию химической модификации аминокислот различными реагентами, такими, как о-фталдальдегид – для первичных аминокислот, фенилизотиоцианат – для вторичных аминокислот, 6-аминохинолин-N-гидроксисукцинимидил карбамат – для обоих типов аминокислот и для цистеина. Для регистрации результатов обычно применяют ультрафиолетовый или флуоресцентный детектор. В последние годы широко внедряются масс-спектрометрические (МС) методы детекции, обладающие более высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью по сравнению с традиционными методами [74].

В работе Н. Kaspar с соавт. [75] было проведено сравнение трех основных методов анализа аминокислот: ГХ-МС, ВЭЖХ-МС и метода с использованием аминокислотного анализатора. Оценивались следующие характеристики: стадия депротенизации, объем пробы, время выполнения анализа, стоимость одного анализа и предел количественного определения. Хроматографические методы продемонстрировали преимущества по времени анализа и количеству израсходованного образца. К особенностям метода ГХ-МС относится меньшая стоимость анализа, высокая производительность и отсутствие необходимости предварительного осаждения белка.

¹³ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>

Для определения фенола используют колориметрический метод, основанный на образовании соединений фенола с 4-аминоантипирином в присутствии феррицианида калия¹⁴, а также метод броматометрического титрования¹⁵. Определение 2-феноксизанола проводят с помощью газовой хроматографии¹⁶. Для определения бензилового спирта применяют ОФ-ВЭЖХ с детекцией в ближней ультрафиолетовой области [76, 77].

Методика количественного определения натрия каприлата в препаратах человеческого альбумина методом ГХ с использованием гептановой кислоты в качестве внутреннего стандарта была разработана в 1980-х гг. [78]. Позднее был предложен упрощенный и быстрый метод определения содержания натрия каприлата с применением ОФ-ВЭЖХ и детектированием в УФ-области [79]. Для повышения чувствительности методики содержание натрия каприлата оценивали по его основному продукту — октановой кислоте после ее предварительной дериватизации омега-бромацетофеноном и 18-краун-6 с последующим анализом методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Nova-Pak C18 [80].

Еще один подход к определению содержания натрия каприлата и каприловой кислоты предложен в работе M. Athavale с соавт. [81], где использовали спектрофотометрический метод с коммерческим набором реагентов для анализа свободных жирных кислот (non-esterified fatty acids, NEFA). Показано, что чувствительность метода составила для каприловой кислоты 7,21 мкг/мл, для натрия каприлата — 8,31 мкг/мл.

Наиболее распространенными методами количественного определения стабилизаторов углеводной природы являются титриметрический и спектрофотометрический. Эти методы применимы для восстанавливающих углеводов, таких как глюкоза, мальтоза и лактоза. В молекулах данных сахаридов присутствует гликозидная гидроксильная группа, вступающая в реакции с окислителями с образованием окрашенных комплексов. Разновидностью спектрофотометрического метода является ферментативный способ, который применим как к восстанавливающим, так и к невосстанавливающим сахаридам. Кроме того, для количественной оценки стабилизаторов углеводной природы производители БЛП применяют поляриметрический и рефрактометрический методы.

Особенности строения углеводов, такие как отсутствие хромофорных групп и наличие многочисленных гидроксильных групп, обуславливают выбор основных методов их хроматографического определения: ион-эксклюзионная ВЭЖХ с применением в качестве неподвижной фазы сульфированного полистирола и дивинилбензола в водородной форме или в форме ионов различных металлов; гидрофильная ВЭЖХ с использованием неподвижных фаз на основе полярных полимеров или химически модифицированного силикагеля. Сахариды характеризуются высокими значениями pK_a и в щелочных условиях способны ионизироваться, что делает возможным их анализ методом ионообменной ВЭЖХ.

Применение новых ВВ требует разработки новых аналитических подходов для их идентификации и количественного определения. Так, описана методика ВЭЖХ с детектором заряженного аэрозоля (HPLC-CAD), предназначенная для идентификации и определения липидных компонентов в инкапсулированных мРНК-вакцинах против COVID-19 [82]. Разнообразие методических решений усложняет процедуру контроля качества БЛП в ходе лабораторной фармацевтической экспертизы и подтверждения качества. Эти сложности связаны с необходимостью широкого технического оснащения испытательной лаборатории и интеграции максимально возможного количества функциональных модулей оборудования.

С целью оптимизации процесса оценки качества БЛП по ряду наиболее востребованных ВВ авторами ранее были разработаны следующие унифицированные методики:

- для оценки полисорбата 80 разработана методика, основанная на методе эксклюзионной ВЭЖХ, позволяющая косвенно оценивать нежелательную деградацию молекулы полисорбата 80 [83, 84];
- для селективного количественного определения аминокислот в составе их композиции (метионин, глицин, лизин, пролин, гистидин, аргинин) предложена методика на основе жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) с использованием доступного для большинства производителей метода ВЭЖХ с УФ-детектированием [85–87];
- для селективного количественного определения стабилизаторов углеводной природы

¹⁴ 01/2008:20515. Phenol in immunosera and vaccines. European Pharmacopeia. 7th ed.; 2018.

¹⁵ Phenol. United States Pharmacopeia. USP41–NF36; 2018.

¹⁶ Phenoxyethanol. United States Pharmacopeia. USP43–NF38: 2020.
07/2016:0781. Phenoxyethanol. European Pharmacopeia. 9th ed.; 2016.

в составе композиций (сорбит, маннит, трегалоза, глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза) разработаны методика гидрофильной ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием и методика ионообменной ВЭЖХ с импульсным амперометрическим детектированием [88–90];

- на основе метода газожидкостной хроматографии разработана методика определения фенола, которая также может быть рассмотрена для оценки 2-феноксиэтанола и м-крезола [91, 92].

Данные методики апробированы на широком спектре БЛП и могут быть верифицированы производителями с целью использования на любых стадиях жизненного цикла БЛП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ позволил систематизировать данные о функциональной классификации ВВ, используемых в БЛП, определить вещества, наиболее часто применяемые в рецептурах БЛП, и установить их влияние на фармакологические свойства действующих веществ. Результаты исследования показали, что вариативность состава ВВ в пределах одного функционального класса может существенно влиять на эффективность и профиль безопасности лекарственных средств, даже в случае одинакового действующего вещества.

В работе рассмотрены данные о потенциальном нежелательном действии ВВ, включая риск сахарозной нефропатии при применении внутривенных препаратов иммуноглобулинов, содержащих сахарозу; гипогликемию, изменение метаболизма аминокислот, снижение синтеза нуклеиновых кислот и угнетение функциональной активности тромбоцитов вследствие

высокой концентрации натрия каприлата в препаратах альбумина. Важным аспектом оценки безопасности использования ВВ является изучение продуктов их деградации.

В исследовании проанализированы современные подходы к выбору ВВ. Рассмотрены инновационные подходы к поиску новых адъювантов, совмещающих функции индукторов иммунного ответа и систем доставки. Представлены данные об использовании математического моделирования при выборе состава композиции ВВ.

Особое внимание уделено современным аналитическим методам количественного определения ВВ. Освещены унифицированные аналитические методики, разработанные авторами с целью оптимизации процесса оценки качества БЛП по ряду наиболее востребованных ВВ, предназначенные для количественного определения полисорбата 80, аминокислот (метионин, глицин, лизин, пролин, гистидин, аргинин), консервантов (фенол, 2-феноксиэтанол, м-крезол), стабилизаторов углеводной природы (сорбит, маннит, трегалоза, глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза).

Выбор ВВ для БЛП представляет собой комплексную задачу и должен предусматривать контроль не только самих вспомогательных компонентов в соответствии с установленными нормами, но и продуктов их возможной деградации и/или образования новых соединений, а также учитывать возможные побочные эффекты. Перспективным направлением дальнейших исследований является разработка унифицированных методик для количественной оценки отдельных групп ВВ и их примесей, что позволит существенно повысить качество и безопасность БЛП на этапах их разработки, регистрационной экспертизы и ввода в гражданский оборот.

Литература/References

1. Abrantes CG, Duarte D, Reis CP. An overview of pharmaceutical excipients: Safe or not safe? *J Pharm Sci.* 2016;105(7):2019–26. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.019>
2. Makkad S, Sheikh M, Shende S, Jirvankar P. Pharmaceutical excipients: Functions, selection criteria, and emerging trends. *Int J Pharm Investig.* 2025;15(2):361–76. <https://doi.org/10.5530/ijpi.20251676>
3. Тенцова АИ, Терешкина ОИ, Рудакова ИП и др. Современные биофармацевтические аспекты вспомогательных веществ. *Фармация.* 2012;(7):3–6. Tentsova AI, Tereshkina OI, Rudakova IP, Samylina IA, Guskova TA, et al. Current biopharmaceutical aspects of excipients. *Pharmacy.* 2012;(7):3–6 (In Russ.). EDN: PEWXXK
4. Jena S, Krishna Kumar NS, Aksan A, Suryanarayanan R. Stability of lyophilized albumin formulations: Role of excipient crystallinity and molecular mobility. *Int J Pharm.* 2019;569:118568. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118568>
5. Thakral S, Sonje J, Munjal B, et al. Mannitol as an excipient for lyophilized injectable formulations. *J Pharm Sci.* 2023;112(1):19–35. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.08.029>
6. Arakawa T, Tsumoto K, Kita Y, et al. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino Acids.* 2007;33(4):587–605. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0506-3>
7. Stärtzel P. Arginine as an excipient for protein freeze – Drying: A mini review. *J Pharm Sci.* 2018;107(4):960–7. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.11.015>
8. Hackl E, Darkwah J, Smith G, Ermolina I. Effect of arginine on the aggregation of protein in freeze-dried formulations containing sugars and polyol: II. BSA reconstitution and aggregation. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(7):2934–47. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1114-0>

9. Ionova Y, Wilson L. Biologic excipients: Importance of clinical awareness of inactive ingredients. *PLoS One*. 2020;15(6):e0235076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235076>
10. Rao VA, Kim JJ, Patel DS, et al. A comprehensive scientific survey of excipients used in currently marketed, therapeutic biological drug products. *Pharm Res*. 2020;37(10):200. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02919-4>
11. Megarry A, Taylor A, Gholami A, et al. Twin-screw granulation and high-shear granulation: The influence of mannitol grade on granule and tablet properties. *Int J Pharm*. 2020;590:119890. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119890>
12. Liu J, Klinzing GR, Nie H. Effect of material properties and variability of mannitol on tablet formulation development. *Pharm Res*. 2023;40(8):2071–85. <https://doi.org/10.1007/s11095-023-03577-y>
13. Chapman SA, Gilkerson KL, Davin TD, Pritzker MR. Acute renal failure and intravenous immune globulin: occurs with sucrose-stabilized, but not with D-sorbitol-stabilized, formulation. *Ann Pharmacother*. 2004;38(12):2059–67. <https://doi.org/10.1345/aph.1E040>
14. Zhang R, Szerlip HM. Reemergence of sucrose nephropathy: acute renal failure caused by high-dose intravenous immune globulin therapy. *South Med J*. 2000;93(9):901–4.
15. Kulkarni SS, Suryanarayanan R, Rinella JV Jr, Bogner RH. Mechanisms by which crystalline mannitol improves the reconstitution time of high concentration lyophilized protein formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;131:70–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.022>
16. Li J, Chen J, An L, et al. Polyol and sugar osmolytes can shorten protein hydrogen bonds to modulate function. *Commun Biol*. 2020;3:528. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01260-1>
17. Fraiese AP, Maillard JY, Sattar SA, eds. Russell, Hugo & Ayliffe's: *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. 5th ed. Chichester: Wiley–Blackwell; 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118425831>
18. Stroppel L, Schultz-Fademrecht T, Cebulla M, et al. Antimicrobial preservatives for protein and peptide formulations: An overview. *Pharmaceutics*. 2023;15(2):563. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020563>
19. Xie J, Ottaviani G, Sun K, et al. Potential confounding effects of benzyl alcohol as a formulation excipient support the elimination of the abnormal toxicity test from pharmacopoeias. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015;73(2):509–14. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.033>
20. Bis RL, Singh SM, Cabello-Villegas J, Mallela KMG. Role of benzyl alcohol in the unfolding and aggregation of interferon α -2a. *J Pharm Sci*. 2014;104(2):407–15. <https://doi.org/10.1002/jps.24105>
21. Zhang Y, Roy S, Jones LS, et al. Mechanism for benzyl alcohol-induced aggregation of recombinant human interleukin-1-receptor antagonist in aqueous solution. *J Pharm Sci*. 2004;93(12):3076–89. <https://doi.org/10.1002/jps.2019>
22. Bis RL, Mallela KM. Antimicrobial preservatives induce aggregation of interferon α -2a: The order in which preservatives induce protein aggregation is independent of the protein. *Int J Pharm*. 2014;472(1–2):356–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.044>
23. Arora J, Joshi SB, Middaugh CR, et al. Correlating the effects of antimicrobial preservatives on conformational stability, aggregation propensity, and backbone flexibility of an IgG1 mAb. *J Pharm Sci*. 2017;106(6):1508–18. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.02.007>
24. Jiang G, Joshi SB, Peek LJ, et al. Anthrax vaccine powder formulations for nasal mucosal delivery. *J Pharm Sci*. 2006;95(1):80–96. <https://doi.org/10.1002/jps.20484>
25. Alsenaidy MA, Kim JH, Majumdar R, et al. High-throughput biophysical analysis and data visualization of conformational stability of an IgG1 monoclonal antibody after deglycosylation. *J Pharm Sci*. 2013;102(11):3942–56. <https://doi.org/10.1002/jps.23730>
26. Telikepalli SN, Kumru OS, Kalonia C, et al. Structural characterization of IgG1 mAb aggregates and particles generated under various stress conditions. *J Pharm Sci*. 2014;103(3):796–809. <https://doi.org/10.1002/jps.23839>
27. Goldberg DS, Lewus RA, Esfandiary R, et al. Utility of high throughput screening techniques to predict stability of monoclonal antibody formulations during early stage development. *J Pharm Sci*. 2017;106(8):1971–7. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.039>
28. Yoshizawa S, Oki S, Arakawa T, Shiraki K. Trimethylamine N-oxide (TMAO) is a counteracting solute of benzyl alcohol for multi-dose formulation of immunoglobulin. *Int J Biol Macromol*. 2018;107(Pt A):984–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.072>
29. Caringal RT, Hickey JM, Sharma N, et al. A combined LC-MS and immunoassay approach to characterize preservative-induced destabilization of human papillomavirus virus-like particles adsorbed to an aluminum-salt adjuvant. *Vaccines (Basel)*. 2024;12(6):580. <https://doi.org/10.3390/vaccines12060580>
30. Johnston A, Uren E, Johnstone D, Wu J. Low pH, caprylate incubation as a second viral inactivation step in the manufacture of albumin. Parametric and validation studies. *Biologicals*. 2003;31(3):213–21. [https://doi.org/10.1016/s1045-1056\(03\)00062-9](https://doi.org/10.1016/s1045-1056(03)00062-9)
31. Ohbo M, Katoh K, Sasaki Y. Effects of saturated fatty acids on amylase release from exocrine pancreatic segments of sheep, rats, hamsters, field voles and mice. *J Comp Physiol B*. 1996;166(5):305–9. <https://doi.org/10.1007/BF02439916>
32. Hillgartner FB, Charron T. Arachidonate and medium-chain fatty acids inhibit transcription of the acetyl-CoA carboxylase gene in hepatocytes in culture. *J Lipid Res*. 1997;38(12):2548–57.
33. Томилин МВ, Короткова ТВ, Логинов ПА. Сравнительный анализ показателей качества лекарственного препарата альбумина человека с измененным стабилизирующим составом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):411–21. Tomilin MV, Korotkova TV, Loginov PA. Comparative analysis of quality attributes of a human albumin preparation with a modified stabilizing composition. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1): 411–21 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-411-421>
34. Grabarek AD, Bozic U, Rousel J, et al. What makes polysorbate functional? Impact of polysorbate 80 grade and quality on IgG stability during mechanical stress. *J Pharm Sci*. 2020;109(1):871–80. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.015>
35. Chen D, Luo W, Hoffman J, et al. Insights into virus inactivation by polysorbate 80 in the absence of solvent. *Biotechnol Prog*. 2020;36(3):e2953. <https://doi.org/10.1002/btpr.2953>
36. Tomlinson A, Demeule B, Lin B, Yadav S. Polysorbate 20 degradation in biopharmaceutical formulations: quantification of free fatty acids, characterization of particulates, and insights into the degradation mechanism. *Mol Pharm*. 2015;12(11):3805–15. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00311>
37. Jones MT, Mahler HC, Yadav S, et al. Considerations for the use of polysorbates in biopharmaceuticals. *Pharm Res*. 2018;35(8):148. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2430-5>

38. Dixit N, Salamat-Miller N, Salinas PA, Taylor KD. Residual host cell protein promotes polysorbate 20 degradation in a sulfatase drug product leading to free fatty acid particles. *J Pharm Sci.* 2016;105(5):1657–66. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.02.029>
39. Hall T, Sandefur SL, Frye CC, et al. Polysorbates 20 and 80 degradation by group XV lysosomal phospholipase A2 iso-mer X1 in monoclonal antibody formulations. *J Pharm Sci.* 2016;105(5):1633–42. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.02.022>
40. Sun MF, Liao JN, Jing ZY, et al. Effects of polyol excipient stability during storage and use on the quality of biopharmaceutical formulations. *J Pharm Anal.* 2022;12(5):774–82. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.03.003>
41. Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol.* 2018;39:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001>
42. O'Hagan DT, Friedland LR, Hanon E, Didierlaurent AM. Towards an evidence based approach for the development of adjuvanted vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2017;47:93–102. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.07.010>
43. Ko EJ, Kang SM. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(12):3041–5. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1495301>
44. Didierlaurent AM, Laupèze B, Di Pasquale A, et al. Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2016;16(1):55–63. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1213632>
45. Del Giudice G, Rappuoli R. Inactivated and adjuvanted influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;386:151–80. https://doi.org/10.1007/82_2014_406
46. Roman F, Clément F, Dewé W, et al. Effect on cellular and humoral immune responses of the AS03 adjuvant system in an A/H1N1/2009 influenza virus vaccine administered to adults during two randomized controlled trials. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(5):835–43. <https://doi.org/10.1128/CVI.00480-10>
47. Караулов АВ, Быков АС, Волкова НВ. Обзор исследований вакцин семейства Гриппол и развития современных адъювантов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2019;18(4):101–19. Karaulov AV, Bykov AS, Volkova NV. Review of Gripol Family vaccine studies and modern adjuvant development. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2019;18(4):101–19 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-101-119>
48. Никифорова АН, Бушменков ДС, Меркулов ВА, Степанов НН. Результаты изучения иммуногенности инактивированной сезонной гриппозной вакцины с адъювантом «Совидон™». *Врач-Провизор-Пациент.* 2011;(1):M8. Nikiforova AN, Bushmenkov DS, Merkulov VA, Stepanov NN. Results of the study of the immunogenicity of the inactivated seasonal influenza vaccine with the adjuvant "Sovidon™". *Doctor-Pharmacist-Patient.* 2011;(1):M8 (In Russ.).
49. Шмаров ММ, Алексеева СВ, Довженко НА и др. Безопасность, реактогенность и иммуногенность векторной вакцины против гриппа А: открытое клиническое исследование I фазы. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2025;25(1):7–21. Shmarov MM, Alekseeva SV, Dovzhenko NA, et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a viral vector vaccine against influenza A: Phase I open clinical trial. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2025;25(1):7–21 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-1-7-21>
50. El Kashif A, Alhashimi M, Sayedahmed EE, et al. Adenoviral vector-based platforms for developing effective vaccines to combat respiratory viral infections. *Clin Transl Immunology.* 2021;10(10):e1345. <https://doi.org/10.1002/cti2.1345>
51. Muravyeva A, Smirnikhina S. Strategies for modifying adenoviral vectors for gene therapy. *Int J Mol Sci.* 2024;25(22):12461. <https://doi.org/10.3390/ijms252212461>
52. Ramachandran S, Satapathy SR, Dutta T. Delivery strategies for mRNA vaccines. *Pharmaceut Med.* 2022;36(1):11–20. <https://doi.org/10.1007/s40290-021-00417-5>
53. Adamo M, Dick LW Jr, Qiu D, et al. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography method for polysorbate 80 quantitation in monoclonal antibody drug products. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(21):1865–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.04.039>
54. Ilko D, Braun A, Germershaus O, et al. Fatty acid composition analysis in polysorbate 80 with high performance liquid chromatography coupled to charged aerosol detection. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;94:569–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.11.018>
55. Christiansen A, Backensfeld T, Kühn S, Weitschies W. Stability of the non-ionic surfactant polysorbate 80 investigated by HPLC-MS and charged aerosol detector. *Pharmazie.* 2011;66(9):666–71. PMID: 22026121
56. Puschmann J, Evers DH, Müller-Goymann CC, Herbig ME. Development of a design of experiments optimized method for quantification of polysorbate 80 based on oleic acid using UHPLC-MS. *J Chromatogr A.* 2019;1599:136–43. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.015>
57. Shende N, Karale A, Bhagade S, et al. Evaluation of a sensitive GC-MS method to detect polysorbate 80 in vaccine preparation. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;183:113126. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113126>
58. Zhang R, Wang Y, Tan L, et al. Analysis of polysorbate 80 and its related compounds by RP-HPLC with ELSD and MS detection. *J Chromatogr Sci.* 2012;50(7):598–607. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms035>
59. Tania TH, Moore JM, Patapoff TW. Single step method for the accurate concentration determination of polysorbate 80. *J Chromatogr A.* 1997;786(1):99–106. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00540-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00540-2)
60. Nair LM, Stephens NV, Vincent S, et al. Determination of polysorbate 80 in parenteral formulations by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A.* 2003;1012(1):81–6. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01105-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01105-1)
61. Shi S, Chen Z, Rizzo JM, et al. A highly sensitive method for the quantitation of polysorbate 20 and 80 to study the compatibility between polysorbates and m-cresol in the peptide formulation. *J Anal Bioanal Tech.* 2015;6(3):1–8. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000245>
62. Fekete S, Ganzler K, Fekete J. Fast and sensitive determination of polysorbate 80 in solutions containing proteins. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;52(5):672–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.02.035>
63. Pan J, Ji Y, Du Z, Zhang J. Rapid characterization of commercial polysorbate 80 by ultra-high performance supercritical fluid chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2016;1465:190–6. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.051>
64. Kim J, Qiu J. Quantitation of low concentrations of polysorbates in high protein concentration formulations by solid phase extraction and cobalt-thiocyanate derivatization. *Anal Chim Acta.* 2014;806:144–51. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.005>
65. Savjani N, Babcock E, Khor HK, Raghani A. Use of ferric thiocyanate derivatization for quantification of polysorbate 80 in high concentration protein formulations.

- Talanta*. 2014;130:542–6.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.052>
66. McKean DL, Pesce AJ, Koo W. Analysis of polysorbate and its polyoxyethylated metabolite. *Anal Biochim*. 1987;161(2):348–51.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90461-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90461-1)
 67. Zheng S, Smith P, Burton L, Adams ML. Sensitive fluorescence-based method for the rapid determination of polysorbate-80 content in therapeutic monoclonal antibody products. *Pharm Dev Technol*. 2015;20(7):872–6.
<https://doi.org/10.3109/10837450.2014.930490>
 68. Berridge BJ, Chao WR, Peters JH. Analysis of plasma and urinary amino acids by ion-exchange column chromatography. *Am J Clin Nutr*. 1971;24(8):934–9.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/24.8.934>
 69. Fekkes D, van Dalen A, Edelman M, Voskuilen A. Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1995;669(2):177–86.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00111-U](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00111-U)
 70. Fekkes D. State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996;682(1):3–22.
[https://doi.org/10.1016/0378-4347\(96\)00057-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(96)00057-6)
 71. Dai Z, Wu Z, Jia S, Wu G. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthalaldehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014;964:116–27.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.025>
 72. Cohen SA. Amino acid analysis using precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Methods Mol Biol*. 2000;159:39–47.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-047-0:039>
 73. Ichihara K, Kohsaka C, Yamamoto Y. Determination of proteinaceous free amino acids by gas chromatography. *Anal Biochem*. 2021;633:114423.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114423>
 74. Desmons A, Thioulouse E, Hautem JY, et al. Direct liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of amino acids in human plasma. *J Chromatogr A*. 2020;1622:461135.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461135>
 75. Kaspar H, Dettmer K, Chan Q, et al. Urinary amino acid analysis: a comparison of iTRAQ-LC-MS/MS, GC-MS, and amino acid analyzer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(20–21):1838–46.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.019>
 76. Mahgoub S. Validated RP-HPLC method for quantitative determination of tolfenamic acid and benzyl alcohol in a veterinary pharmaceutical preparation. *Austin Chromatogr*. 2017;4(1):1046.
 77. Čudina OA, Čomor MI, Janković I.A. Simultaneous determination of bifonazole and benzyl alcohol in pharmaceutical formulations by reverse-phase HPLC. *Chroma*. 2005;61:415–8.
<https://doi.org/10.1365/s10337-005-0524-9>
 78. Yu MW, Finlayson JS. Quantitative determination of the stabilizers octanoic acid and N-Acetyl-DL-tryptophan in human albumin products. *J Pharm Sci*. 1984;73(1):82–6.
<https://doi.org/10.1002/jps.2600730122>
 79. Dengler T, Kellner S, Fürst G. Quantitative determination of sodium-octanoate in human serum albumin preparations. *Infusionstherapie*. 1988;15(6):273–4.
<https://doi.org/10.1159/000222305>
 80. Jiang CL, Wang LN, Han JH, Ye J. Detection of sodium caprylate in human serum albumin by precolumn derivation reversed phase high performance liquid chromatography. *Chinese J Anal Chem*. 2010;38(3):425–8.
<https://doi.org/10.3724/SP.J.1096.2010.00425>
 81. Athavale M, Fernandes A, Kaundinya J, Daftary G. Validation of a simple, rapid and cost effective method for the estimation of caprylic acid and sodium caprylate from biological products using NEFA-C kit. *Biologicals*. 2010;38(2):321–4.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.10.001>
 82. Yang H, Fei C, Wang S, et al. Validation of an HPLC-CAD method for measuring the lipid content of novel LNP-encapsulated COVID-19 mRNA vaccines. *J Virol Methods*. 2024;330:115040.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2024.115040>
 83. Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Разработка методики количественного определения полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Химико-фармацевтический журнал*. 2024;57(12):59–64.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-12-59-64>
 - Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Development of a quantitative determination method for polysorbate 80 in biologicals by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Pharm Chem J*. 2024;57(12):2013–8.
<https://doi.org/10.1007/s11094-024-03110-4>
 84. Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Определение полисорбата 80 в биологических лекарственных препаратах. Патент Российской Федерации № 2812788; 2024. Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Determination of polysorbate 80 in biological medicinal products. Patent of the Russian Federation No 2812788; 2024 (In Russ.). EDN: VMQXVZ
 85. Rounova O, Demin P, Korotkov M, et al. Development of a hydrophilic interaction high-performance liquid chromatography method for the determination of glycine in formulations of therapeutic immunoglobulins. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(26):6935–42.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1297-y>
 86. Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Разработка условий прямого количественного определения аминокислот в биологических лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(6):53–8.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2021-55-6-53-58>
 - Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Development of the conditions for direct quantitative determination of amino acids in biologicals by hydrophilic interaction HPLC. *Pharm Chem J*. 2021;55(6):621–6.
<https://doi.org/10.1007/s11094-021-02467-0>
 87. Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Способ количественного определения глицина в биологических лекарственных препаратах методом гидрофильной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Патент Российской Федерации № 2700831; 2019. Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Method for quantitative determination of glycine in biological medicinal preparations by hydrophilic high-performance liquid chromatography. Patent of the Russian Federation No 2700831; 2019 (In Russ.). EDN: FQWVES
 88. Минеро АС, Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Разработка методики ионообменной ВЭЖХ для количественного определения стабилизаторов углеводной природы в биологических лекарственных препаратах. *Химико-фармацевтический журнал*. 2023;57(4):59–64.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-4-59-64>
 - Minero AS, Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Development of an ion-exchange HPLC technique for quantitative determination of carbohydrate stabilizers in biological medicinal products. *Pharm Chem J*. 2023;57(4):578–83.
<https://doi.org/10.1007/s11094-023-02923-z>

89. Минеро АС, Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Разработка методики количественного определения стабилизаторов углеводной природы в биологических лекарственных препаратах на основе метода ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием. *Химико-фармацевтический журнал*. 2024;58(3):54–9. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2024-58-3-54-59>
Minero AS, Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Development of a method for the quantitative determination of carbohydrate stabilizers in biological drugs based on the HPLC method with refractometric detection. *Pharm Chem J*. 2024;58(3):512–8. <https://doi.org/10.1007/s11094-024-03172-4>
90. Минеро АС, Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Определение стабилизаторов углеводной природы в биологически активных препаратах. Патент Российская Федерация № 2816030; 2024. Minero AS, Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Determination of carbohydrate stabilizers in biologically active preparations. Patent of the Russian Federation No 2816030; 2024 (In Russ.). EDN: [LWHOTE](#)
91. Колесникова ОН, Рунова ОБ, Устинникова ОБ. Разработка и валидация методики количественного определения фенола методом газожидкостной хроматографии в биологических лекарственных препаратах. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(5):60–4. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-5-60-64>
Kolesnikova ON, Runova OB, Ustinnikova OB. Development and validation of a gas-liquid chromatography method for quantitative determination of phenol in biological medicinal products. *Pharm Chem J*. 2018;52(5):478–82. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1843-0>
92. Колесникова ОН, Устинникова ОБ, Рунова ОБ. Способ количественного определения фенола методом газожидкостной хроматографии в биологических лекарственных препаратах. Патент Российская Федерация № 2693518; 2019. Kolesnikova ON, Ustinnikova OB, Rounova OB. Method for quantitative determination of phenol in biological medicinal preparations by gas-liquid chromatography. Patent of the Russian Federation No 2693518; 2019 (In Russ.). EDN: [CMEFUS](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.С. Минеро** — написание текста рукописи, оформление списка литературы; **О.Б. Рунова** — написание текста рукописи, формулировка выводов исследования; **И.М. Щербаченко** — систематизация и обобщение данных литературы; **О.Б. Устинникова** — идея исследования, написание текста рукописи, окончательное утверждение версии статьи 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. Minero** drafted the manuscript and prepared the list of references. **O.B. Rounova** drafted the manuscript and formulated the conclusions. **I.M. Shcherbachenko** generalised the materials and interpreted the results. **O.B. Ustinnikova** conceptualised the study, drafted the manuscript, and approved the final version for publication.

Об авторах / Authors

Минеро Анастасия Сальвадоровна / Anastasia S. Minero

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>

Рунова Ольга Борисовна, канд. хим. наук / **Olga B. Rounova**, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0729-530X>

Щербаченко Ирина Михайловна, канд. биол. наук / **Irina M. Shcherbachenko**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9378-3312>

Устинникова Ольга Борисовна, канд. биол. наук / **Olga B. Ustinnikova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5432-1887>

Поступила 25.04.2025

После доработки 11.08.2025

Принята к публикации 12.09.2025

Received 25 April 2025

Revised 11 August 2025

Accepted 12 September 2025

УДК 57.083.1:579.61:57.083.134

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-321-331>

Оригинальная статья | Original article



Сравнительная оценка контроля качества питательных сред с использованием лиофилизированных тест-штаммов «ЛИОШТАММ»: результаты межлабораторных испытаний

А.А. Воропаев[✉], О.В. Фадейкина, Р.М. Валюхова, Ю.И. Крысанова,
Д.С. Давыдов, С.В. Овсиенко

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

✉ Воропаев Андрей Андреевич; voropaev@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Микробиологический контроль качества лекарственных препаратов основан на использовании эталонных тест-штаммов, характеризующихся стабильными культурально-морфологическими свойствами. Применение стандартизированных по количеству жизнеспособных клеток тест-штаммов микроорганизмов в лиофилизированном виде позволяет снизить трудоемкость проведения испытаний в сравнении с традиционным методом приготовления микробных суспензий.

ЦЕЛЬ. Сравнительная оценка воспроизводимости, однородности и стабильности результатов при контроле ростовых свойств питательных сред с использованием традиционного метода приготовления микробных суспензий и метода на основе лиофилизированных тест-штаммов «ЛИОШТАММ», стандартизированных по числу жизнеспособных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали два тест-штамма – *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony IHE 103/39 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Сравнивали метод, основанный на использовании стандартизированных лиофилизированных образцов «ЛИОШТАММ» (по одной серийной партии каждого штамма, стандартизированной по числу жизнеспособных клеток), и референс-метод, основанный на использовании микробных суспензий, приготовленных согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (общая фармакопейная статья «Микробиологическая чистота»). Исследование проводили в семи независимых лабораториях в течение 3 сут. Всего получено 378 индивидуальных результатов для каждой серии «ЛИОШТАММ» и 126 – для референс-метода.

РЕЗУЛЬТАТЫ. При исследовании ростовых свойств питательных сред оба тест-штамма, приготовленные с использованием образцов «ЛИОШТАММ», продемонстрировали соответствие всем критериям приемлемости: количество колониеобразующих единиц (КОЕ) на чашку составило 10–100, также были подтверждены типичные культурально-морфологические свойства и время роста. Внутрелабораторная прецизионность (RSD) варьировала от 7 до 21% для метода с использованием «ЛИОШТАММ» и от 2 до 36% для референс-метода. Показатель межлабораторной прецизионности для метода с использованием образцов «ЛИОШТАММ» составил 15–17%, тогда как для референс-метода – 38–45%. Время появления видимых колоний (≈ 18 ч) и их культурально-морфологические свойства не имели значимых отличий между методами. Анализ межфлаконной однородности показал совпадение средних значений и относительных стандартных отклонений (RSD) в рамках внутрелабораторного производственного контроля ($n=5$) и в ходе межлабораторных испытаний ($n=63$), что свидетельствует о стабильности серии «ЛИОШТАММ» ($RSD \leq 17\%$).

ВЫВОДЫ. Метод контроля питательных сред с использованием стандартизированных лиофилизированных тест-штаммов «ЛИОШТАММ» обеспечивает получение результатов, сопоставимых с традиционным методом по ростовым и морфологическим характеристикам. Ключевым преимуществом метода является значительное повышение межлабораторной воспроизводимости за счет снижения вариабельности более чем в два раза. Тест-штаммы «ЛИОШТАММ» могут быть рекомендованы в качестве стандартизированных образцов для рутинного микробиологического контроля и валидации аналитических методик.

Ключевые слова: контроль качества питательных сред; лиофилизированные тест-штаммы; ростовые свойства; микробиологическая чистота; культурально-морфологические свойства; воспроизводимость; межлабораторная прецизионность; межлабораторные испытания

Для цитирования: Воропаев А.А., Фадейкина О.В., Валухова Р.М., Крысанова Ю.И., Давыдов Д.С., Овсиенко С.В. Сравнительная оценка контроля качества питательных сред с использованием лиофилизированных тест-штаммов «ЛИОШТАММ»: результаты межлабораторных испытаний. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):321–331. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-321-331>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Фадейкина О.В. является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2025 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Comparative evaluation of nutrient media quality control using LYOSHTAMM lyophilised test strains: Results of interlaboratory trials

Andrey A. Voropaev✉, Olga V. Fadeikina, Ruzilya M. Valyukhova, Julia I. Krysanova, Dmitry S. Davydov, Sergey V. Ovsienko

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Andrey A. Voropaev; voropaev@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Microbiological quality control of medicinal products relies on the use of reference test strains with stable cultural and morphological properties. Use of lyophilised test strains standardised by number of viable cells reduces the labour intensity of testing compared to the traditional method of preparing microbial suspensions.

AIM. This study aimed to evaluate reproducibility, homogeneity, and stability of results when assessing growth-promoting properties of nutrient media using traditional preparation method of microbial suspensions and the method based on LYOSHTAMM lyophilised test strains standardised by the number of viable cells.

MATERIALS AND METHODS. Two test strains were used: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony IHE 103/39 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Compared was the method using standardised lyophilised LYOSHTAMM samples (one batch per strain, standardised by the number of viable cells) and the reference method. The latter uses microbial suspensions prepared in compliance with the Russian State Pharmacopoeia (pharmacopoeial monograph "Microbiological purity"). The study was conducted across seven independent laboratories over three days. A total of 378 individual results were obtained for each LYOSHTAMM batch and 126 results – for the reference method.

RESULTS. When evaluating growth-promoting properties of the media, both test strains based on LYOSHTAMM samples met all acceptability criteria: the number of colony-forming units per plate ranged from 10 to 100; typical cultural and morphological properties and growth time was confirmed. Intralaboratory precision (RSD) ranged from 7% to 21% for LYOSHTAMM method and from 2% to 36% for reference method. The interlaboratory precision for LYOSHTAMM

samples was 15–17%, while for reference method, it was 38–45%. Time to visible colonies (≈ 18 hours) and their cultural and morphological properties showed no significant differences between the methods. Analysis of inter-vial homogeneity showed consistent mean values and relative standard deviations at intralaboratory production control ($n=5$) and interlaboratory trials ($n=63$), confirming the stability of LYOSHTAMM batch (relative standard deviation $\leq 17\%$). **CONCLUSIONS.** The control method for nutrient media using standardised lyophilised LYOSHTAMM test strains yields results comparable to the traditional method in terms of growth and morphology. A key advantage of this method is a significantly improved interlaboratory reproducibility, with a more than two-fold reduction in variability. LYOSHTAMM test strains can be recommended as reference standards for routine microbiological testing and analytical validation.

Keywords: nutrient media quality control; lyophilized test strains; growth-promoting properties; microbiological purity; cultural and morphological characteristics; reproducibility; interlaboratory precision; interlaboratory trials

For citation: Voropaev A.A., Fadeikina O.V., Valyukhova R.M., Krysanova Ju.I., Davydov D.S., Ovsienko S.V. Comparative evaluation of nutrient media quality control using LYOSHTAMM lyophilised test strains: Results of interlaboratory trials. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):321–331. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-321-331>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. O.V. Fadeikina has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2025. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Микробиологический контроль является критически важным элементом фармацевтического производства, подтверждая качество и безопасность лекарственных средств¹ [1–3]. Основные аспекты микробиологического контроля включают мониторинг производственной среды, тестирование препаратов на стерильность или микробиологическую чистоту, а также использование тест-штаммов микроорганизмов для валидации методики оценки качества питательных сред [4, 5]. Каждая партия питательных сред подлежит обязательному тестированию с использованием тест-штаммов для подтверждения способности поддерживать рост соответствующих микроорганизмов, что особенно важно для эффективного обнаружения микробного загрязнения, вызванного даже единичными клетками [6–8].

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)² производители должны получать тест-штаммы из официальных коллекций и поддерживать рабочие культуры, ограничивая число последовательных пассажей, чаще всего не более пяти, что минимизирует риск накопления мутационных изменений и фенотипического дрейфа [9–11]. Поддержание рабочих культур

тест-штаммов в лабораторных условиях представляет собой ресурсоемкую задачу, требующую значительных временных затрат со стороны персонала.

Для оптимизации процесса испытаний в мировой практике широко применяют готовые к использованию лиофилизированные тест-штаммы, такие как BioBall (Biomerieux)³, Vitroids (Merck)⁴ или MicroQuant⁵ (American Type Culture Collection). Однако данные тест-штаммы производятся преимущественно иностранными компаниями из США и Европы, что создает для российских производителей устойчивую зависимость от импортных поставок [12].

Для решения данной проблемы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) был разработан инновационный продукт «ЛИОШТАММ» для микробиологического контроля. Его применение обеспечивает высокое качество испытаний при значительном снижении временных и трудовых затрат. Схематическое сравнение традиционного метода подготовки культур и метода с использованием образцов «ЛИОШТАММ» представлено на рисунке 1.

¹ Hock SC, Dong HS, Chan Rui JT, Chan L.W. Contamination trends & proposed solutions. *Pharmaceutical Engineering*; 2023. <https://ispe.org/pharmaceutical-engineering/march-april-2023/contamination-trends-proposed-solutions>

² ОФС.1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

³ https://www.mediray.co.nz/media/15675/br_biomerieux_test_kits_bioballs-booklet-english-0315-march-2015-new-rev-g-8.pdf

⁴ <https://www.sigmaaldrich.cn/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/906/730/vitroids-datasheet.pdf>

⁵ <https://www.atcc.org/resources/application-notes/development-and-performance-evaluation-of-microquant>

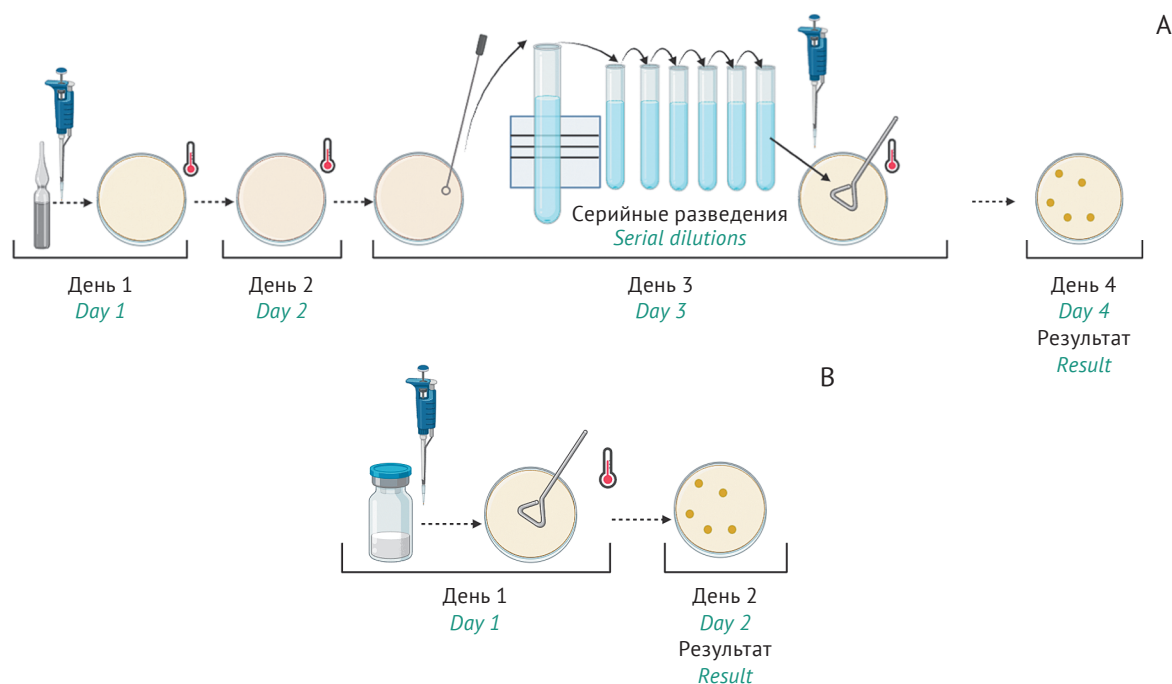


Рисунок подготовлен авторами с использованием шаблонов biorender.com / This figure is prepared by the authors using the templates from biorender.com

Рис. 1. Схема процессов подготовки микробиологических культур при оценке ростовых свойств питательных сред: традиционный метод (А); метод с использованием лиофилизированных образцов «ЛИОШТАММ» (В).

Fig. 1. Preparing microbial cultures for assessment of growth-promoting properties in nutrient media: (A) traditional approach; (B) use of LYOSHTAMM in culture preparation for assessment of growth-promoting properties of nutrient media.

В отличие от существующих коммерческих аналогов (BioBall, Vitroids), образцы «ЛИОШТАММ» произведены в ГКПМ из исходных культур тест-штаммов со строгим контролем пассажного уровня. Такой подход позволяет минимизировать риск накопления генетических мутаций и изменения культурально-морфологических свойств тест-штаммов.

Стандартизированные по числу жизнеспособных клеток тест-штаммы рассматриваются в настоящее время как ключевой инструмент обеспечения однородности инокулюма и сопоставимости результатов микробиологических испытаний между различными лабораториями, что существенно снижает неопределенность контроля качества лекарственных препаратов [13–15]. Среди альтернативных методов подготовки культур (глубокое замораживание, периодические пересевы) лиофилизация признана оптимальной технологией, так как она позволяет получать крупные партии однородного материала, значительно снижает риск генетического дрейфа, обеспечивает длительную сохранность жизнеспособности при температуре 4 °C

и более высокой, а также упрощает логистику [16–19]. Дополнительным преимуществом лиофилизированных эталонов является их доказанная стабильность в течение нескольких лет хранения [20–22].

Цель работы – сравнительная оценка воспроизводимости, однородности и стабильности результатов при контроле ростовых свойств питательных сред с использованием традиционного метода приготовления микробных суспензий и метода на основе лиофилизированных тест-штаммов «ЛИОШТАММ», стандартизированных по числу жизнеспособных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы:

– специальным образом подготовленные тест-штаммы микроорганизмов, рекомендованные для проведения испытаний согласно требованиям ОФС.1.2.4.0002.18⁶, ОФС.1.2.4.0003.15⁷ и ОФС.1.1.0021.18⁸, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony IHE 103/39 (ГКПМ 100329); *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (ГКПМ 201108) [23];

⁶ ОФС.1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁷ ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁸ ОФС.1.1.0021.18 Валидация микробиологических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

- питательные среды: № 1 ГРМ (кат. № 039-K-193, серия 039-K-186, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора), триптиказеино-соевый агар (Condalab, Испания); триптон-соевый агар (HiMedia, Индия); соево-казеиновый агар (Biomerieux, Франция);
- стандартные образцы мутности: фармакопейный стандартный образец (ФСО) мутности бактериальных взвесей 20 МЕ (ФСО.3.1.00085, серия S-2/8-010122, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); ФСО мутности бактериальных взвесей 10 МЕ (ФСО.3.1.00084); стандарт мутности по МакФарланду (HiMedia, Индия); стандартный образец мутности бактериальных взвесей (ООО «Ормет», Россия);
- раствор натрия хлорида 0,9% («Бормовский завод медицинских препаратов», Беларусь; ООО «Гематек», Россия; ООО ТК «Красная звезда», Россия; ООО ТД «Химмед», Россия).

Оборудование:

- шкаф ламинарный БАВп-01-1,2 класса защиты II (ЗАО «Ламинарные системы», Россия);
- термогигрометр ИВА-6 (ООО НТК «Микрофор», Россия);
- дозаторы пипеточные механические одноканальные 100–1000 мкл (Sartorius, Финляндия; Sartorius Biohit Liquihg, Франция; ЗАО «Термо

Фишер Сайентифик», Россия; ООО «Ленпипет», Россия);

- CO₂-инкубатор CO₂cell (MMM Group, Германия);
- инкубаторы LIB-300M (Labtech, Корея) и BD 400 (Binder GmbH, Германия);
- инкубатор с естественной конвекцией Binder BD 240 (Binder, Германия);
- термостаты суховоздушные ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) и ST 1/1/1 (Pol-Eco Aparatura, Польша).

Методы

Определение количества жизнеспособных микробных клеток. Методика посева. Испытания проводили бактериологическим методом⁹ в течение 3 сут. Ежедневно анализировали три флакона с лиофилизированными образцами «ЛИОШТАММ» (*S. Abony* IHE 103/39 и *S. aureus* ATCC 6538). Лيوфилизат ресуспендировали в стерильной воде или 0,9% растворе натрия хлорида в течение 1 мин в объеме 1,0 мл для штамма *S. Abony* IHE 103/39 и 2,0 мл для штамма *S. aureus* ATCC 6538. Полученную суспензию из каждого флакона инокулировали на три чашки с питательной средой (объем посева 0,1 мл); процедуру проводили два независимых оператора.

Количество проведенных испытаний. Исследование выполняли в семи испытательных центрах (табл. 1). Ежедневно в каждом

Таблица 1. Испытательные центры – участники исследования
Table 1. Test centers participating in the study

№	Испытательный центр <i>Test center</i>	Город <i>City</i>
1	ООО «КоАЛФарманализ» <i>CoAL Pharmed LLC</i>	Москва <i>Moscow</i>
2	ООО «Испытательный центр лекарственных средств «Биотехнология» <i>ICLS Biotechnology LLC</i>	Видное <i>Vidnoe</i>
3	ООО Научно-испытательный центр «ФАРМОБОРОНА» <i>Farmoborona Research and Testing Center, LLC</i>	Королев <i>Korolev</i>
4	Лаборатория антибиотиков ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России <i>Antibiotic Laboratory, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products</i>	Москва <i>Moscow</i>
5	Ярославский филиал ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора <i>Information and Methodological Center for Examination, Accounting and Analysis of Circulation of Medicinal Products, Yaroslavl branch</i>	Ярославль <i>Yaroslavl</i>
6	Красноярский филиал ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора <i>Information and Methodological Center for Examination, Accounting and Analysis of Circulation of Medicinal Products, Krasnoyarsk branch</i>	Красноярск <i>Krasnoyarsk</i>
7	Московский филиал ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора <i>Information and Methodological Center for Examination, Accounting and Analysis of Circulation of Medicinal Products, Moscow branch</i>	Москва <i>Moscow</i>

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

Примечание. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России; ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора – ФГБУ «Информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора.

⁹ ОФС.1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

центре анализировали три флакона каждого тест-штамма, что соответствовало учету 18 чашек в 1 сут. За 3 сут в каждом центре было испытано 9 флаконов и получено 54 результата подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). Всего было протестировано 63 флакона и получено 378 результатов подсчета КОЕ для каждого тест-штамма.

В качестве референс-метода использовали стандартную методику подготовки культуры согласно ГФ РФ ОФС.1.2.4.0002.18¹⁰. Референс-штаммы активировали двумя последовательными пассажами на питательных средах. Из суточной культуры второго пассажа готовили суспензию с мутностью 10 МЕ по стандартным образцам мутности. Далее из исходной суспензии готовили серию десятикратных разведений; инокуляцию проводили посевом 0,1 мл из шестого разведения на три чашки с питательной средой. Всего было приготовлено 42 суспензии, что обеспечило получение 126 результатов подсчета КОЕ для каждого тест-штамма.

Превосходящий объем данных при испытании образцов «ЛИОШТАММ» по сравнению с референс-методом обусловлен задачей исследования по оценке пригодности стандартизированных образцов «ЛИОШТАММ» в качестве альтернативы традиционному методу.

Учет результатов проводили через 18, 24 и 48 ч инкубации путем подсчета количества колоний на чашке. Критерием приемлемости результатов считали наличие от 10 до 100 колоний на чашке, что соответствует требуемой концентрации 10^3 КОЕ/мл в суспензии.

Определение культурально-морфологических свойств видимых колоний и время их появления оценивали визуально.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ выполняли с использованием программы Minitab¹¹. Рассчитывали среднее арифметическое значение ($\bar{X}$), стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD, %). Для количественной оценки влияния лабораторных условий на результаты количественного определения жизнеспособных клеток был проведен однофакторный анализ ANOVA. Значимость факторов определяли при уровне $p < 0,05$. Величину вклада фактора R^2 рассчитывали как отношение суммы квадратов отклонений по фактору к общей сумме квадратов.

Критерии приемлемости микробиологических испытаний с использованием стандартизированных тест-штаммов «ЛИОШТАММ»:

- концентрация жизнеспособных клеток в восстановленном препарате из флакона должна находиться в пределах 10^3 КОЕ/мл;
- культурально-морфологические свойства тест-штаммов и время появления колоний должны быть идентичны таковым при использовании референс-метода;
- прецизионность методики (воспроизводимость) должна соответствовать установленным критериям для микробиологических методов анализа – RSD между результатами не должно превышать 35%¹².

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение культурально-морфологических свойств тест-штаммов и времени появления колоний

Культурально-морфологические свойства колоний обоих штаммов (*S. Abony* IHE 103/39 и *S. aureus* ATCC 6538) были идентичны независимо от метода подготовки инокуляма – как для образцов «ЛИОШТАММ», так и для образцов, подготовленных с использованием референс-метода. Колонии *S. Abony* IHE 103/39 имели круглую форму, были полупрозрачными, блестящими, с ровным или слегка волнистым краем. Колонии *S. aureus* ATCC 6538 характеризовались круглой формой, были выпуклые, блестящие, золотистого цвета.

Во всех испытательных центрах был зарегистрирован видимый рост колоний обоих тест-штаммов через 18 ч инкубации как в случае образцов, подготовленных с использованием референс-метода, так и при использовании образцов «ЛИОШТАММ». Это свидетельствует об отсутствии задержки роста у лиофилизированных образцов и подтверждает их функциональную эквивалентность традиционному методу. Важно отметить, что, в соответствии с фармакопейными требованиями к тестированию ростовых свойств питательных сред, учет результатов проводится в интервале до 48 ч¹³.

Сравнение внутрилабораторной прецизионности

Во всех испытательных центрах (табл. 2) использование образцов «ЛИОШТАММ» при определении количества жизнеспособных клеток

¹⁰ ОФС.1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹¹ <https://www.minitab.com/fr-fr/>

¹² ОФС.1.1.0021.18 Валидация микробиологических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

¹³ ОФС.1.2.4.0002.18 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 2. Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности при определении количества жизнеспособных клеток с использованием образцов «ЛИОШТАММ» и образцов, подготовленных по референс-методу
Table 2. Results of the in-lab precision assessment for the viable cell count using LYOSHTAMM samples and samples prepared by the reference method

Испытательный центр, № Test centre, No.	Количество колоний <i>S. Abony</i> IHE 103/39, шт. Number of <i>S. Abony</i> IHE 103/39 colonies, pcs				Количество колоний <i>S. aureus</i> ATCC 6538, шт. Number of <i>S. aureus</i> ATCC 6538 colonies, pcs			
	«ЛИОШТАММ» LYOSHTAMM		Референс-метод Reference method		«ЛИОШТАММ» LYOSHTAMM		Референс-метод Reference method	
	$\bar{X} \pm SD, n=54$	RSD, %	$\bar{X} \pm SD, n=18$	RSD, %	$\bar{X} \pm SD, n=54$	RSD, %	$\bar{X} \pm SD, n=18$	RSD, %
1	61±9	14	59±9	15	50±9	17	55±9	16
2	70±10	14	94±4	4	48±7	14	84±4	5
3	79±7	10	37±4	12	44±7	17	32±8	27
4	60±6	9	85±2	2	51±5	10	94±3	3
5	76±14	19	87±5	6	48±5	9	60±4	7
6	56±4	7	64±3	5	57±4	7	59±4	7
7	67±14	21	27±8	31	53±8	15	16±6	36

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

Примечание. $\bar{X} \pm SD$ – среднееарифметическое значение $\pm$ стандартное отклонение; n – количество результатов испытаний; RSD – относительное стандартное отклонение.
Note. $\bar{X} \pm SD$, arithmetic mean $\pm$ standard deviation; n , number of test results; RSD, relative standard deviation.

позволило получить результаты, соответствующие критериям приемлемости (10–100 колоний на чашку). Внутрилабораторная прецизионность метода, оцененная по RSD, при использовании образцов «ЛИОШТАММ» составила от 7 до 21%, а при использовании образцов, подготовленных по референс-методу, – от 2 до 36%.

Применение стандартизированных образцов «ЛИОШТАММ» позволило добиться большей стабильности и воспроизводимости результатов определения ростовых свойств питательных сред, что подтверждается узким диапазоном значений количества жизнеспособных клеток. Так, для тест-штамма *S. Abony* IHE 103/39 количество колоний при использовании «ЛИОШТАММ» варьировало в узком диапазоне значений (56–79 колоний), тогда как при использовании референс-метода был зафиксирован широкий разброс значений (27–94 колонии). Повышенная вариабельность референс-метода может быть обусловлена необходимостью выполнения многоэтапной процедуры подготовки инокулюма, включающей доведение мутности суспензии до 10 МЕ и приготовление серийных разведений. Отсутствие этих этапов при работе с образцами «ЛИОШТАММ» способствует снижению совокупной лабораторной неопределенности и повышению воспроизводимости. Показатели вариабельности, полученные при испытании образцов «ЛИОШТАММ», сопоставимы с данными коммерческих аналогов: BioBalls (9–16%) и EZ-AccuShot (10%) [13, 14].

Сравнение межлабораторной воспроизводимости

Для оценки межлабораторной воспроизводимости был проведен однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), где в качестве влияющего фактора выступал испытательный центр, а откликом служило количество колоний. Результаты представлены в таблице 3 и на рисунке 2. Вклад межлабораторного фактора при использовании референс-метода составил 95% для обоих тест-штаммов, что свидетельствует о практически полной зависимости результатов от условий конкретного испытательного центра. Использование образцов «ЛИОШТАММ» позволило значительно снизить влияние этого фактора до 27–32%.

Общая вариабельность результатов между испытательными центрами (межлабораторное RSD) при использовании референс-метода составила 38% для *S. Abony* IHE 103/39 и 45% для *S. aureus* ATCC 6538. При использовании «ЛИОШТАММ» эти показатели были существенно ниже – 17 и 15% соответственно (рис. 3). Эти данные подтверждают практическую значимость стандартизированных образцов для обеспечения устойчивости и воспроизводимости результатов микробиологического контроля в различных лабораториях.

Оценка однородности серии «ЛИОШТАММ» при производстве

Каждая производственная серия «ЛИОШТАММ» проходит контроль однородности

Таблица 3. Результаты оценки межлабораторной воспроизводимости с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) при использовании образцов «ЛИОШТАММ» и образцов, приготовленных по референс-методу
Table 3. Results of the interlaboratory reproducibility assessment using one-way analysis of variance (ANOVA) with LYOSHTAMM samples and samples prepared by the reference method

Метод Method	Тест-штамм Test strain	p-значение p-value	f-критерий f-value	Вклад влияющего фактора R ² , % Contribution of the influencing factor R ² , %
«ЛИОШТАММ» LYOSHTAMM	S. Abony IHE 103/39	<0,001	28,89	31,84
Референс-метод Reference method	S. Abony IHE 103/39	<0,001	389,82	95,16
«ЛИОШТАММ» LYOSHTAMM	S. aureus ATCC 6538	<0,001	23,35	27,41
Референс-метод Reference method	S. aureus ATCC 6538	<0,001	389,41	95,12

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

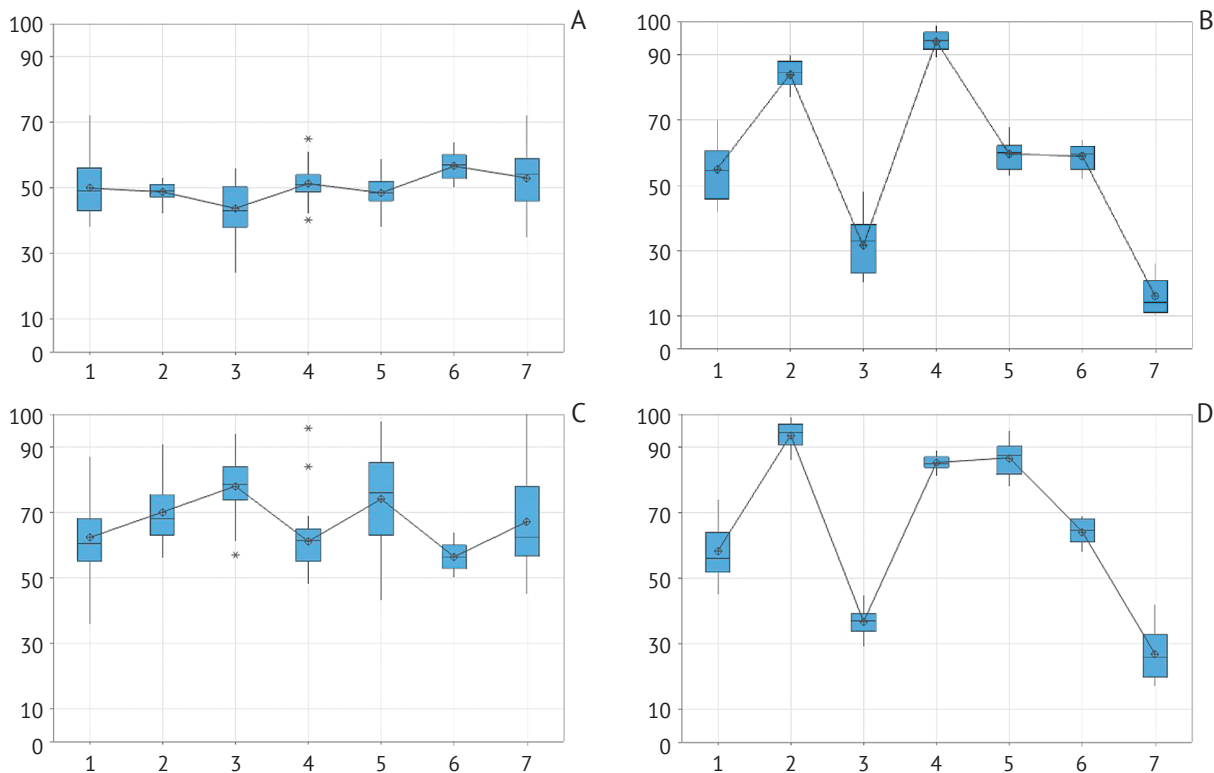


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным с помощью программы Minitab / The figure is prepared by the authors with Minitab program using their own data

Рис. 2. Сравнение межлабораторной воспроизводимости с использованием образцов «ЛИОШТАММ» ($n=54$) и образцов, подготовленных с помощью референс-метода ($n=18$). Ось X – номер испытательного центра; ось Y – количество колоний, шт. Данные получены с использованием тест-штамма *S. aureus* ATCC 6538: образцов «ЛИОШТАММ» (A) и образцов, приготовленных по референс-методу (B); и тест-штамма *S. Abony* IHE 103/39: образцов «ЛИОШТАММ» (C) и образцов, приготовленных по референс-методу (D).

Fig. 2. Comparison of interlaboratory reproducibility using LYOSHTAMM samples ($n=54$) and samples prepared by the reference method ($n=18$). X axis: test centre code; Y axis: colony count, pcs. Data obtained with test strain *S. aureus* ATCC 6538: LYOSHTAMM samples (A) and reference method samples (B); test strain *S. Abony* IHE 103/39: LYOSHTAMM samples (C) and reference method samples (D).

по количеству жизнеспособных микроорганизмов на выборке из пяти флаконов. Для оценки репрезентативности такого объема выборки данные в ходе внутрилабораторного контроля при изготовлении серии сравнивали с результатами межлабораторных испытаний,

проведенных на большом количестве образцов (табл. 4). Такое сопоставление является ключевым элементом обоснования возможности использования выборки из ограниченного числа флаконов (пять флаконов) при контроле однородности серии. Этот подход особенно важен

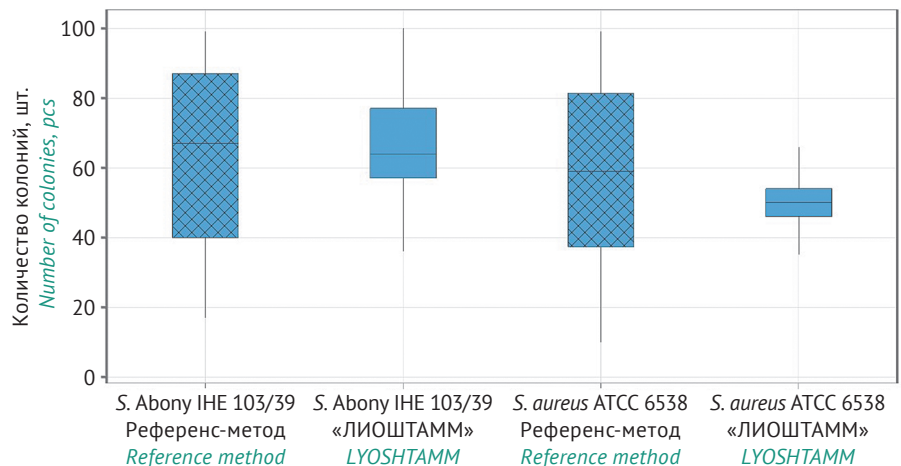


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным с помощью программы Minitab / The figure is prepared by the authors with Minitab program using their own data

Рис. 3. Сравнение вариабельности результатов при определении количества жизнеспособных клеток, полученных с использованием образцов «ЛИОШТАММ» ($n=378$) и образцов, приготовленных по референс-методу ($n=126$), для каждого тест-штамма.

Fig. 3. Comparison of variability in viable cell count results obtained using LYOSHTAMM samples ($n=378$) and samples prepared by the reference method ($n=126$) for each test strain.

Таблица 4. Сравнение результатов определения количества жизнеспособных клеток в серии «ЛИОШТАММ», полученных при внутрилабораторном контроле производства серии образцов и в ходе межлабораторных испытаний

Table 4. Comparison of viable cell count results for LYOSHTAMM series obtained during in-house production control of the sample series and interlaboratory testing

Наименование тест-штамма <i>Test strain</i>	Количество испытуемых образцов (флаконы), шт. <i>Number of test samples (vials), pcs.</i>	Количество жизнеспособных клеток в образце, $\bar{X} \pm SD$, КОЕ/мл <i>Mean number of viable cells in the sample, $\bar{X} \pm SD$, CFU/ml</i>	RSD, %
Результаты, полученные при производстве серии образцов <i>Results obtained from the production of a series of samples</i>			
S. Abony IHE 103/39	5	660 $\pm$ 110	17
S. aureus ATCC 6538	5	560 $\pm$ 60	11
Результаты, полученные в ходе межлабораторных испытаний <i>Results obtained during interlaboratory studies</i>			
S. Abony IHE 103/39	63	670 $\pm$ 111	17
S. aureus ATCC 6538	63	501 $\pm$ 53	10

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

для препаратов, содержащих патогенные микроорганизмы, для которых недопустим избыточный расход материала.

Сравнение показало сходимость значений RSD (17% для S. Abony IHE 103/39 и 10–11% для S. aureus ATCC 6538) и приемлемое соответствие средних значений, несмотря на незначительное снижение в условиях межлабораторных испытаний. Последнее может быть обусловлено различиями в условиях восстановления и культивирования лиофилизата в разных лабораториях (например, использовались питательные среды различных производителей).

Таким образом, полученные данные подтверждают, что оценка однородности серии по выбор-

ке из пяти флаконов является репрезентативной и достаточной. Это позволяет применять серии «ЛИОШТАММ» не только для проведения рутинного микробиологического контроля, но и в качестве стандартизированных образцов для валидации аналитических микробиологических методик.

ВЫВОДЫ

1. Стандартизированные по количеству жизнеспособных клеток образцы тест-штаммов «ЛИОШТАММ» обеспечивают получение надежных и воспроизводимых результатов, сопоставимых с данными, полученными референс-методом. Внутрилабораторная вариабельность (RSD) для образцов «ЛИОШТАММ»

составила 7–21%, в то время как для референс-метода разброс значений был значительно шире (2–36%).

2. Применение образцов «ЛИОШТАММ» исключает трудоемкие этапы подготовки культур традиционным методом (активация тест-штамма, стандартизация по мутности и приготовление серийных разведений), что приводит к значительному снижению вариабельности результатов (межлабораторное RSD для образцов «ЛИОШТАММ» 15–17% против 38–45% для образцов, приготовленных по референс-методу) и сокращению временных затрат персонала.
3. Сравнение результатов межлабораторных испытаний с данными, полученными при внутри-

лабораторном контроле производства серии образцов «ЛИОШТАММ» на пяти флаконах, показало их статистическую сопоставимость, что подтверждает репрезентативность выбранного объема выборки для оценки однородности серии.

4. Образцы тест-штаммов «ЛИОШТАММ» могут быть рекомендованы к применению в качестве стандартизированных образцов для рутинного микробиологического контроля и валидации аналитических методик. Использование данного продукта будет способствовать повышению качества микробиологических испытаний и снижению зависимости от импортной продукции.

Литература/References

1. Gupta D, Bhatt S, Shulka P, Kumar A. Microbial contamination in pharmaceutical manufacturing. *J Drug Discov Health Sci.* 2024;1(01):21–7. <https://doi.org/10.21590/yafz5353>
2. Tyski S, Burza M, Laudy AE. Microbiological contamination of medicinal products — Is it a significant problem? *Pharmaceuticals (Basel).* 2025;18(7):946. <https://doi.org/10.3390/ph18070946>
3. de Sousa Lima CM, Fujishima MAT, de Paula Lima B, et al. Microbial contamination in herbal medicines: a serious health hazard to elderly consumers. *BMC Complement Med Ther.* 2020;20(1):17. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2723-1>
4. Han-Min O. Selection of bacterial strains in a testing microbiology laboratory for quality assurance purposes: ISO/IEC 17025: 2017 standard point of view. *Accred Qual Assur.* 2025;30:95–101. <https://doi.org/10.1007/s00769-024-01615-9>
5. Moira DJ. A simple and rapid test for quality control of liquid media, using the bioscreen microbiological growth analyser. *J Microbiol Methods.* 1998;32(1):37–43. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(98\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00007-4)
6. Суханова СМ. Стандартизация требований к питательным средам, используемым для оценки качества лекарственных средств (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2023;12(1):123–30. Sukhanova SM. Standardization of requirements for culture media used to assess the quality of drugs (Review). *Drug Development & Registration.* 2023;12(1):123–30 (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-123-130>
7. Кулешова СИ, Процак СА, Лисунова СА, Романюк ГЮ. Стабильность готовых и приготовленных в лаборатории питательных сред. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2021;11(2):130–4. Kuleshova SI, Protsak SA, Lisunova SA, Romanyuk GYu. Stability of ready-to-use and laboratory-prepared culture media. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2021;11(2):130–4 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-2-130-134>
8. Basu S, Pal A, Desai PK. Quality control of culture media in a microbiology laboratory. *Indian J Med Microbiol.* 2005;23(3):159–63. [https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)02585-8](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)02585-8)
9. Moser AI, Campos-Madueno EI, Perreten V, Endimiani A. Genome stability during serial subculturing in hyperepidemic multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Glob Antimicrob Resist.* 2022;31:152–61. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.08.014>
10. Wassenaar TM, Zimmermann K. How industrial bacterial cultures can be kept stable over time. *Lett Appl Microbiol.* 2020;71(3):220–8. <https://doi.org/10.1111/lam.13309>
11. Sabol A, Joung YJ, Van Tubbergen C, et al. Assessment of genetic stability during serial *in vitro* passage and *in vivo* carriage. *Foodborne Pathog Dis.* 2021;18(12):894–901. <https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0029>
12. Singh KA, Rai R, Nair SS. Review on development of assigned value microbiological reference materials used in food testing. *Food Microbiol.* 2022;102:103904. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103904>
13. Verdonk GP, Willemse MJ, Hoefs SG, et al. The most probable limit of detection (MPL) for rapid microbiological methods. *J Microbiol Methods.* 2010;82(3):193–7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.04.012>
14. Kurniawan YN, Yuji S, Koji S. Evaluation of a microbiological reference standard (EZ-AccuShot™) as test material for proficiency testing (PT) scheme in the breweries. *J Am Soc Brew Chem.* 201876(4):219–22. <https://doi.org/10.1080/03610470.2018.1502010>
15. Hong SK, Choi SJ, Shin S, et al. Establishing quality control ranges for antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*: a cornerstone to develop reference strains for Korean clinical microbiology laboratories. *Ann Lab Med.* 2015;35(6):635–8. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.6.635>
16. Liu K, Ma W, Jin G. Research progress on improving the survival rate and extending the storage period of lactic acid bacteria through vacuum freeze-drying. *Food Sci.* 2024;45(2):325–33. <https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-20230801-002>
17. Dias FRS, Lourenço FR. Measurement uncertainty evaluation and risk of false conformity assessment for microbial enumeration tests. *J Microbiol Methods.* 2021;189:106312. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106312>
18. Bernal-Mercado AT, Gutierrez-Pacheco MM, Encinas-Basurto D, et al. Synergistic mode of action of catechin, vanillic and protocatechuic acids to inhibit the adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* on silicone surfaces. *J Appl Microbiol.* 2020;128(2):387–400. <https://doi.org/10.1080/03610470.2018.1502010>
19. Boyd P, Eaton S, Magee J. The stability of micro-organisms preserved in LENTICULE discs, demonstrated by repeat sample distributions of the EQUAL Scheme for In-

- icator Organisms (water microbiology). *J Appl Microbiol.* 2006;100(2):272–8.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02774.x>
20. Kupletskaya MB, Netrusov AI. Viability of lyophilized microorganisms after 50-year storage. *Microbiology.* 2011;80(6):850–3.
<https://doi.org/10.1134/S0026261711060129>
21. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. *Cryobiology.* 2006;52(1):27–32.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.09.002>
22. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J Microbiol Methods.* 2006;66(2):183–93.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
23. Ворopaев АА, Крысанова ЮИ, Фадейкина ОВ и др. Лиофилизация стандартизированных по количеству жизнеспособных клеток микроорганизмов в низкой концентрации: разработка режима высушивания. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2025;25(2):193–202. Voropaev AA, Krysanova Yul, Fadeikina OV, et al. Lyophilization of microorganisms standardized by the number of viable cells in low concentration: Development of a drying mode. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2025;25(2):193–202 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-193-202>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Ворopaев** — концепция и дизайн исследования, написание текста рукописи, формулировка выводов; **О.В. Фадейкина** — написание текста рукописи, формулировка выводов, статистическая обработка данных; **Р.М. Вaлюхова** — написание текста рукописи; **Ю.И. Крысанова** — поиск и систематизация данных литературы; **Д.С. Давыдов** — участие в формулировке выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **С.В. Овсиенко** — концепция исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность коллегам за высокий профессионализм в проведении микробиологических испытаний в соответствии со стандартизированными протоколами и консультативную поддержку в интерпретации результатов.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Voropaev** developed the concept, wrote the manuscript, and formulated conclusions. **O.V. Fadeikina** wrote the manuscript, formulated conclusions and performed statistical calculations. **R.M. Valyukhova** wrote the manuscript. **Ju.I. Krysanova** worked with literature sources. **D.S. Davydov** participated in formulating conclusions and approved the final version for publication. **S.V. Ovsienko** organised the testing and approved the final version for publication.

Acknowledgements. The authors are grateful to the colleagues for their high level of professionalism in microbiological testing in accordance with standardised protocols and for their advisory support in interpreting the results.

Об авторах / Authors

Ворopaев Андрей Андреевич / Andrey A. Voropaev

<https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук / Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)

<https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

Вaлюхова Рузиля Маратовна / Ruzilya M. Valyukhova

<https://orcid.org/0009-0004-8389-3058>

Крысанова Юлия Игоревна / Julia I. Krysanova

<https://orcid.org/0000-0001-8893-0621>

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук / Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.)

<https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>

Овсиенко Сергей Васильевич, канд. фарм. наук / Sergey V. Ovsienko, Cand. Sci. (Pharm.)

<https://orcid.org/0000-0001-9649-716X>

Поступила 04.06.2025

После доработки 03.09.2025

Принята к публикации 12.09.2025

Received 4 June 2025

Revised 3 September 2025

Accepted 12 September 2025



Распространенность и генотипическая характеристика вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска в Гомельской области: результаты скрининга 11382 женщин за 2018–2023 гг.

О.П. Логинова^{1,✉}, Н.И. Шевченко¹, А.В. Воропаева¹, Е.Л. Гасич²

¹ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», ул. Ильича, д. 290, г. Гомель, 246040, Республика Беларусь

² Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», ул. Филимонова, д. 23, г. Минск, 220114, Республика Беларусь

✉ Логинова Ольга Павловна; loginovaolga81@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Вирус папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) является доказанным этиологическим фактором развития рака шейки матки. Проведение скрининга с генотипированием ВПЧ среди женщин и выявлением значимых для региона генотипов вируса важно для реализации программ вакцинации против ВПЧ.

ЦЕЛЬ. Изучить распространенность, спектр и региональные особенности ВПЧ ВКР у женщин из разных районов Гомельской области за 2018–2023 гг. до начала кампании массовой вакцинопрофилактики в Республике Беларусь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. За 2018–2023 гг. обследовано 11382 женщины из Гомельской области и г. Гомеля в возрасте от 18 до 79 лет. У каждой участницы исследования забирались образцы биоматериала (соскобы из цервикального канала шейки матки) для последующего молекулярно-генетического анализа методом полимеразной цепной реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Всего было обнаружено 14 разных генотипов ВПЧ. Частота встречаемости ВПЧ ВКР составила 9% в общей популяции женщин и 9,7% у женщин репродуктивного возраста. Высокая частота встречаемости ВПЧ ВКР отмечена у женщин раннего репродуктивного возраста в группе 18–24 года – 18,8% (95% ДИ 16,8–20,9), 25–29 лет – 12,1% (95% ДИ 10,3–14,1), 30–34 года – 9,2% (95% ДИ 7,8–10,7). Один генотип ВПЧ был обнаружен с частотой 78,6%, сочетание двух генотипов ВПЧ – 14,5%, три и более генотипов – 6,9%. Наиболее распространены ВПЧ 16 (52,2%), 18 (15,1%), 51 (18,9%), 56 (9,8%) и 31 (9,7%) генотипов. Вклад в инфицирование женщин ВПЧ ВКР вносят группы α9 (16 и 31 генотипы), α7 (18 генотип), α5 (51 генотип) и α6 (56 генотип). Выявлено изменение структуры доминирующих генотипов ВПЧ ВКР за последние 10 лет в Гомельской области.

ВЫВОДЫ. Установлена высокая распространенность ВПЧ ВКР среди женщин репродуктивного возраста в Гомельском регионе. Данные о геномном разнообразии ВПЧ в регионе имеют большое значение для молекулярно-эпидемиологического надзора и помогут оценить эффективность программы вакцинации против ВПЧ-инфекции в Республике Беларусь, которая стартовала в 2025 г.

Ключевые слова: вирус папилломы человека; генотип; геномика; новообразования шейки матки; женщины; ПЦР; ВПЧ; распространенность; программы иммунизации; раннее выявление рака

Для цитирования: Логинова О.П., Шевченко Н.И., Воропаева А.В., Гасич Е.Л. Распространенность и генотипическая характеристика вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска в Гомельской области: результаты скрининга 11382 женщин за 2018–2023 гг. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):332–342. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-332-342>

Финансирование. Исследование выполнено в рамках проекта «Разработать и внедрить алгоритм скрининговых мероприятий по раннему выявлению рака шейки матки» (номер государственной регистрации 20180787 от 01.06.2018); в рамках НИР международного сотрудничества Роспотребнадзора со странами Восточной Европы и Центральной Азии «Характеристика генетических вариантов ВПЧ у женщин, живущих с ВИЧ/СПИД, в пилотных регионах» (номер государственной регистрации 20241379 от 28.06.2024).

Потенциальный конфликт интересов. Е.Л. Гасич является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2023 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Prevalence and genotypic distribution of high-risk human papilloma virus in Gomel region: Screening results of 11,382 women over 2018–2023

Volha P. Lohinava^{1,✉}, Natalia I. Shevchenko¹, Alla V. Voropayeva¹, Elena L. Gasich²

¹ Republican Scientific and Practical Centre of Radiation Medicine and Human Ecology, 290 Ilyich Street, Gomel 246040, Republic of Belarus

² Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology of the Republican Centre for Hygiene, Epidemiology and Public Health, 23 Filimonov Street, Minsk 220114, Republic of Belarus

✉ Volha P. Lohinava; loginovaolga81@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. High-risk human papillomavirus (hrHPV) is a proven etiological factor in prevalence of cervical cancer. Screening with HPV genotyping in women and identifying significant regional virus genotypes is vital for implementation of HPV immunisation programmes.

AIM. This study aimed to examine the prevalence, spectrum, and regional characteristics of hrHPV in women from different districts of Gomel region in 2018–2023, prior to the mass vaccination programme in the Republic of Belarus.

MATERIALS AND METHODS. A total of 11,382 women from Gomel region and the city of Gomel aged 18 to 79 years were examined in 2018–2023. Biomaterial samples (endocervical scrapings) were taken from each study participant for subsequent molecular genetic analysis using polymerase chain reaction.

RESULTS. A total of 14 different HPV genotypes have been detected. The incidence of hrHPV was 9% in the overall population and 9.7% in women of reproductive age. High hrHPV incidence was noted in women of early reproductive age: group of 18–24 years – 18.8% (95% CI 16.8–20.9), 25–29 years – 12.1% (95% CI 10.3–14.1), and 30–34 years – 9.2% (95% CI 7.8–10.7). A single HPV genotype was detected most frequently (78.6%); a combination of two HPV genotypes was detected in 86 patients (14.5%); ≥3 genotypes – in 41 patients (6.9%). The most common genotypes were 16 (52.2%), 18 (15.1%), 51 (18.9%), 56 (9.8%), and 31 (9.7%) HPV. Groups α9 (16 and 31 genotypes), α7 (18 genotype), α5 (51 genotype), and α6 (56 genotype) most frequently caused hrHPV infection in women. A change has been found in the structure of dominant hrHPV genotypes in Gomel region over the past 10 years.

CONCLUSION. A high hrHPV prevalence has been established among women of reproductive age in Gomel region. Data on HPV genomic diversity in the region are essential for molecular epidemiological surveillance and will help assess the effectiveness of the Republican HPV immunisation programme launched in 2025.

Keywords:

human papillomavirus; genotype; genomics; uterine cervical neoplasms; women; PCR; HPV; prevalence; immunization programs; immunisation programmes; early diagnosis of cancer

For citation:

Lohinava V.P., Shevchenko N.I., Voropayeva A.V., Gasich E.L. Prevalence and genotypic distribution of high-risk human papilloma virus in Gomel region: Screening results of 11,382 women over 2018–2023. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):332–342. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-332-342>

Funding. The study was conducted within the project “Developing and implementing a screening algorithm for early detection of cervical cancer” (State registration No. 20180787 as of 01.06.2018); as part of research and development project for international cooperation of Rospotrebnadzor with the Eastern Europe and Central Asia countries “Analysing HPV genetic variations in women with HIV/AIDS in pilot regions” (State registration No. 20241379 as of 06.28.2024).

Disclosure. Elena L. Gasich has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2023. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус папилломы человека (ВПЧ) — один из основных возбудителей вирусной этиологии среди инфекций репродуктивного тракта. ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) является доказанным этиологическим фактором развития цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) и рака шейки матки (РШМ) [1, 2].

Международное агентство по изучению рака (The International Agency for Research on Cancer) выделяет следующие подтипы ВПЧ по степени онкогенности: канцерогенные подтипы ВПЧ (группа 1); вероятные канцерогенные подтипы ВПЧ (группа 2A); возможные канцерогенные подтипы ВПЧ (группа 2B); подтипы ВПЧ низкого риска (группа 3) и те подтипы, которые не классифицированы по степени онкогенности. Наибольший канцерогенный потенциал характерен для ВПЧ 16 генотипа; ВПЧ 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 генотипов классифицируются как канцерогенные для человека; ВПЧ 68 генотипа — вероятно канцерогенный; ВПЧ 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97 генотипов — возможно канцерогенные; ВПЧ 6, 11, 42, 43 и 44 генотипов — низкий канцерогенный риск [3–6]. Существует еще классификация на основе различий геномов ВПЧ и филогенетической топологии, в которой выделяют $\alpha 5$ (26, 51, 69 и 82 генотипы), $\alpha 6$ (30, 53, 56 и 66 генотипы), $\alpha 7$ (19, 39, 45 и 59 генотипы), $\alpha 9$ (16, 31, 33, 35, 52 и 58 генотипы), $\alpha 11$ (34 и 73 генотипы), $\alpha 13$ (54 генотип) и $\alpha 3$ (61 генотип) [7].

Распространенность и спектр различных генотипов ВПЧ ВКР варьируются в различных странах и даже в пределах одной страны, при этом 70% всех случаев РШМ в мире ассоциированы с ВПЧ 16 и 18 генотипов [8, 9]. Показана взаимосвязь частоты обнаружения и спектра генотипов ВПЧ с такими факторами, как возраст, половое поведение и социально-экономические особенности исследуемой популяции [10, 11].

Например, в Европейском регионе преобладают ВПЧ 16, 18, 45, 31, 33 генотипов¹. В странах Азии после ВПЧ 16 и 18 генотипов наиболее распространены 52 и 58 генотипы, преобладая над 31 и 45 генотипами [9, 12]. Эти различия могут влиять как на эффективность программы вакцинопрофилактики, так и на необходимость корректировки программ скрининга при распространении новых вариантов вируса.

Таким образом, проведение локального скрининга среди женщин репродуктивного возраста целесообразно дополнять генотипированием ВПЧ и обнаружением наиболее значимых для региона генотипов с учетом возрастных групп. Эти данные будут способствовать дальнейшей оценке эффективности региональных программ скрининга и вакцинации против ВПЧ, которая с 01.01.2025 включена в Национальный календарь профилактических прививок Республики Беларусь и предусматривает вакцинацию девочек и женщин в возрасте от 11 до 50 лет с ВИЧ-инфекцией, ранее не привитых против ВПЧ-инфекции².

Цель работы — изучить распространенность, спектр и региональные особенности ВПЧ ВКР у женщин из разных районов Гомельской области за 2018–2023 гг. до начала кампании массовой вакцинопрофилактики в Республике Беларусь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования. Всего в исследовании приняли участие 11382 женщины. 11146 женщин (86,3% — репродуктивного возраста) из четырех районов Гомельской области: Хойникский ($n=2800$), Чечерский ($n=1640$), Ветковский ($n=1912$), Добрушский ($n=4794$). Средний возраст участниц исследования, которых обследовали в 2018–2021 гг., составил 38 ± 10^3 лет (от 18 до 79 лет). В исследование также были включены 236 женщин (90,7% — репродуктивного

¹ <https://hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>

² Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.07.2024 № 111. https://minzdrav.gov.by/upload/lcfiles/постановление_M3_2024_111.pdf

³ Среднее значение $\pm$ среднеквадратичное отклонение.

возраста) из г. Гомеля и Гомельского района, которых обследовали в 2022–2023 гг.

От всех участниц исследования получены письменные добровольные информированные согласия на участие в исследовании.

Образцы биоматериала. Соскобы из цервикального канала шейки матки (ШМ) забирались в районных женских консультациях врачами акушерами-гинекологами и доставлялись в лабораторию для молекулярно-генетического анализа методом ПЦР. На начальном этапе в образцах, взятых от всех пациенток, определяли ВПЧ 16, 18 и других генотипов с использованием набора Abbott RealTime High Risk (HR) HPV (Abbott, США), что рекомендовано ВОЗ при проведении скрининга. После обнаружения других генотипов ВПЧ ВКР проводили подтверждающий анализ образцов ($n=593$) для определения конкретного генотипа ВПЧ с использованием набора «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Статистическая обработка данных. Возраст участниц исследования представлен как среднее значение $\pm$ среднее квадратичное отклонение ($M \pm SD$). Показатели частоты обнаружения генотипов ВПЧ представлены в процентах с расчетом 95% доверительных интервалов (ДИ). Для анализа таблиц сопряженности использовался критерий хи-квадрат (χ^2); в случае неприятия статистической гипотезы при проверке критерием χ^2 применялся точный критерий Фишера. Для анализа упорядоченных категориальных данных использовали тест Кохрана – Армитажа (Cochran – Armitage test) в случае, если вторая переменная была бинарной; тест

линейно-линейной ассоциации (linear-by-linear association) использовали в случае двух переменных с упорядоченными категориями. Расчеты проводились при использовании статистического пакета R v.4.1. (R Core Team, 2023) и Microsoft Excel 10. Результаты анализа считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным, ДНК ВПЧ ВКР была обнаружена в 9,0% исследованных образцов (1022/11382), а среди женщин репродуктивного возраста частота обнаружения ВПЧ ВКР составила 9,7% (952/9831), что согласуется с общемировыми данными. Так, распространенность ВПЧ среди женщин с нормальной цитологической картиной шейки матки в мире составляет около 11–12% [13], при этом по оценкам D.A. Obeid с соавт. самые высокие показатели наблюдаются в странах Северо-Восточной Африки (21%) [9]; в Восточной Европе (21,4%) и Латинской Америке (16%), у здоровых женщин в возрасте старше 30 лет распространенность ВПЧ составляет около 11,7% (95% ДИ 11,6–11,7) [13]. В отдельных странах распространенность ВПЧ может составлять от 2 до 42% [14, 15].

Спектр обнаруженных генотипов ВПЧ ВКР и частота их обнаружения в районах Гомельской области были сопоставимы (табл. 1): частота встречаемости ВПЧ ВКР варьировала от 8,1 (Добрушский район) до 9,3% (Чечерский район). Во всех районах преобладал ВПЧ 16 генотипа (2,2%) – от 2,0% (Ветковский район) до 2,9% (Чечерский район); второе место принадлежало ВПЧ 18 генотипа – от 0,4%

Таблица 1. Распределение генотипов вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) в районах Гомельской области (2018–2021 гг.)

Table 1. Distribution of high-risk human papillomavirus (hrHPV) genotypes in Gomel region districts, 2018–2021

Генотипы ВПЧ HPV genotypes	Район, n (%) / District, n (%)				
	Добрушский Dobrush	Чечерский Chachersk	Хойникский Khoyniki	Ветковский Vetka	Всего Total
16	99 (2,1)	48 (2,9)	61 (2,2)	39 (2,0)	247 (2,2)
18	25 (0,5)	11 (0,7)	10 (0,4)	12 (0,6)	58 (0,5)
16, 18	6 (0,1)	2 (0,1)	1 (0,04)	0	9 (0,1)
16 и другие / and others	14 (0,3)	4 (0,2)	9 (0,3)	8 (0,4)	35 (0,3)
18 и другие / and others	6 (0,1)	0	5 (0,2)	4 (0,2)	15 (0,1)
16, 18 и другие / and others	2 (0,04)	0	3 (0,1)	1 (0,1)	6 (0,1)
Другие / Others	236 (4,9)	88 (5,4)	152 (5,4)	109 (5,7)	585 (5,3)
Всего / Total	388 (8,1)	153 (9,3)	241 (8,6)	173 (9,0)	955 (8,6)
Число обследованных женщин Number of women examined	4794	1640	2800	1912	11146

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

(Хойникский район) до 0,7% (Чечерский район). Сочетание нескольких генотипов ВПЧ регистрировалось практически во всех районах с частотой — от 0,1 до 0,4%. Другие генотипы ВПЧ чаще всего выявлялись в Ветковском (5,7%) и реже — в Добрушском (4,9%) районах.

Учитывая, что женщины проживали в районах, расположенных в разных частях Гомельской области, а также ввиду отсутствия статистически значимых ($p=0,523$) отличий частот обнаружения ВПЧ ВКР, полученные результаты были экстраполированы на всю Гомельскую область (рис. 1, табл. 1).

Анализ распространения ВПЧ ВКР в разных возрастных группах продемонстрировал наиболее высокую частоту встречаемости у женщин в возрастной группе 18–24 года — 18,8% (95% ДИ 16,8–20,9). В группах 25–29 лет и 30–34 года ВПЧ ВКР обнаружен с частотой 12,1% (95% ДИ 10,3–14,1) и 9,2% (95% ДИ 7,8–10,7) соответственно (табл. 2). Полученные данные объясняются высокой сексуальной активностью у молодых женщин, что значительно повышает риск инфицирования ВПЧ. Аналогичные данные опубликованы N. Berza с соавт. [15], которые показали, что максимальная распространенность ВПЧ среди женщин в Европе наблюдается в возрастной группе до 30 лет.

В возрастных группах обследуемых женщин позднего репродуктивного возраста (40–49 лет)

и ≥ 50 лет отмечено снижение частоты встречаемости ВПЧ ВКР, которая составила 5,5% (95% ДИ 4,5–6,6) и 4,1% (95% ДИ 3,2–5,3) соответственно (табл. 2). Следовательно, частота инфицирования ВПЧ ВКР женщин раннего репродуктивного возраста значимо выше и влечет необходимость включения их в группу высокого риска развития предопухолевой патологии ШМ, ассоциированной с ВПЧ. Кроме того, результаты настоящего исследования важны для изучения эпидемиологии ВПЧ-инфекции как социально значимого заболевания. Например, прогнозировалось негативное влияние ВПЧ-инфекции на экономическую и демографическую составляющие в случае смерти женщины или утраты ею репродуктивной способности [16].

Анализ результатов генотипирования 593 образцов позволил оценить вклад отдельных генотипов ВПЧ ВКР и/или их комбинации в формирование генотипической структуры, а также оценить их представленность в Гомельской области. Установлено, что наиболее распространенными генотипами ВПЧ в Гомельской области за исследуемый период были 16, 18, 51, 56 и 31 генотипы (рис. 2). Затем в порядке убывания распределились частоты встречаемости ВПЧ 52, 33, 45, 66, 58, 39, 59, 35, 68 генотипов.

Анализ пейзажа основных генотипов ВПЧ в Гомельской области за последние 15 лет продемонстрировал значительные отличия. Так,



Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Карта Гомельской области: районы, в которых проводилось скрининговое исследование, выделены темно-желтым цветом.

Fig. 1. Map of Gomel region: districts where the screening took place are in dark yellow color.

Таблица 2. Частота обнаружения вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) у женщин в разных возрастных группах**Table 2.** Detection frequency of high-risk human papillomavirus (hrHPV) among women of different age groups

Группы <i>Groups</i>	Возрастная группа, n (%) / <i>Age group, n (%)</i>						
	18–24	25–29	30–34	35–39	40–44	45–49	≥50
Все женщины ^a <i>All women^a</i>	1432 (12,8)	1219 (10,9)	1593 (14,3)	1670 (15)	1830 (16,4)	1870 (16,8)	1532 (13,7)
Женщины с обнаруженным ВПЧ ^b <i>Women, HPV detected^b</i>	269 (18,8)	147 (12,1)	146 (9,2)	121 (7,2)	107 (5,8)	102 (5,5)	63 (4,1)
95% ДИ / <i>CI</i>	16,8–20,9	4,1–10,3	7,8–10,7	6,1–8,6	4,8–7,0	4,5–6,6	3,2–5,3

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

Примечание. ВПЧ – вирус папилломы человека; обнаруженный ВПЧ – вирус папилломы человека обнаружен методом полимеразной цепной реакции; ДИ – доверительный интервал.

Note. HPV, human papillomavirus; HPV detected, human papillomavirus detected by polymerase-chain reaction; CI, confidence interval.

^a n=11146.

^b n=955.

В.Н. Беляковским с соавт. [17] при изучении распространения генотипов ВПЧ в группе женщин с РШМ в Гомельской области за 2000–2005 гг. установлено, что встречаемость ВПЧ ВКР 16 генотипа составила 64,7±3,3% ($p<0,05$). В исследовании авторы указали, что при РШМ чаще выявляли ВПЧ 58 генотипа по сравнению с остальными 11 генотипами, а в отношении ВПЧ 45, 31, 39, 59, 66 генотипов различия были значимыми ($p<0,05$) [17].

Спектр и частота встречаемости основных генотипов ВПЧ в общей популяции женщин Гомельской области в 2009–2010 гг. описаны А.Н. Волченко [18]. Показано, что частота встречаемости ВПЧ 16 генотипа составила 29,4% (95% ДИ 20,8–38,0) (первое место), ВПЧ 56 генотипа – 15,9% (95% ДИ 6,5–25,3) (второе место), ВПЧ 31 генотипа – 14,3% (95% ДИ 4,8–23,8)

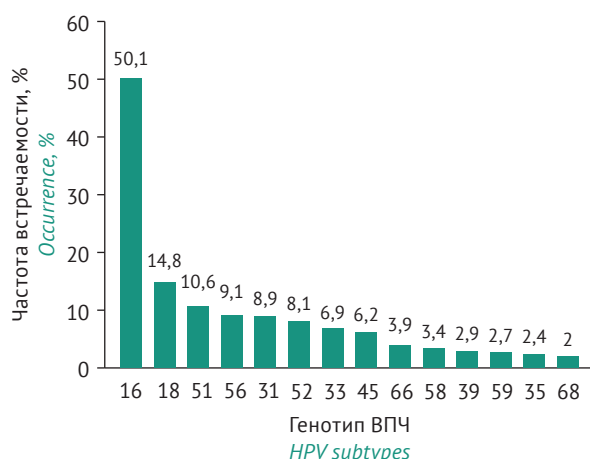


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Частота встречаемости онкогенных генотипов вируса папилломы человека (ВПЧ) в Гомельской области (n=593).**Fig. 2.** Occurrence of carcinogenic human papillomavirus (HPV) genotypes in Gomel region (n=593).

(третье место), остальные генотипы ВПЧ распределились в следующем порядке по убыванию – 51, 52, 33, 39, 58, 45, 18, 35, 59. ВПЧ 18 генотипа – один из основных онкогенных генотипов, занимал десятое место по частоте встречаемости – 9,9% (95% ДИ 0,1–19,7) [18].

Для оценки стабильности генетического ландшафта за последние 10–15 лет проведено сравнение спектра и частоты встречаемости различных генотипов ВПЧ ВКР в Гомельской области за 2009–2010 гг. (исследование А.Н. Волченко [18]) и данных настоящего исследования за 2018–2021 гг. (табл. 3). Так как данные В.Н. Беляковского с соавт. [17] получены только в отношении группы пациенток с РШМ, они не включались в анализ. Установлено, что в общей популяции значимо увеличилось инфицирование 16 ($p<0,001$) и 18 ($p=0,034$) генотипами ВПЧ. Так, в 2018–2021 гг. частота встречаемости ВПЧ 16 генотипа возросла на 20,7% (95% ДИ 14,3–27,1), а ВПЧ 18 генотипа – на 4,9% (95% ДИ 0,5–9,4) по сравнению с 2009–2010 гг.

В период 2018–2021 гг. на первом ранговом месте по-прежнему находился ВПЧ 16 генотипа, но частота его встречаемости увеличилась до 50,1%. Второе ранговое место занимал ВПЧ 18 генотипа (14,8%); третье место – ВПЧ 51 генотипа (10,6%), хотя в сравнении с данными А.Н. Волченко [18] частота его обнаружения снизилась на 3,4% (95% ДИ –8–1,2). На четвертом и пятом местах находились ВПЧ филогенетической группы $\alpha 9$ – 56 (9,1%) и 31 (8,9%) генотипы соответственно. Необходимо отметить, что в сравнении с периодом 2009–2010 гг. частота инфицирования ВПЧ 56 и 31 генотипов также значимо снизилась. Следовательно, в настоящее время наибольший вклад в инфицированность женщин ВПЧ ВКР в Гомельской области вносят филогенетические группы $\alpha 9>\alpha 7>\alpha 5$.

Таблица 3. Сравнение спектра и частоты встречаемости разных генотипов вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) в популяции женщин Гомельской области в 2009–2010 и 2018–2021 гг.

Table 3. Comparison of the spectrum and prevalence of various high-risk human papillomavirus (hrHPV) genotypes of the female population in Gomel region for 2009–2010 and 2018–2021

Генотип ВПЧ HPV genotype	Исследование / Research 2009–2010, n=364	Исследование / Research 2018–2021, n=593	Изменения в пропорциях Changes in proportions	p-значение p-value
	n (%)	n (%)	% (95% ДИ/CI)	
16	107 (29,4)	297 (50,1)	20,7 (14,3–27,1)	<0,001
18	36 (9,9)	88 (14,8)	4,9 (0,5–9,4)	0,034
31	52 (14,3)	53 (8,9)	–5,3 (–9,8...–0,9)	0,014
33	44 (12,1)	41 (6,9)	–5,2 (–9,3...–1)	0,009
35	32 (8,8)	14 (2,4)	–6,4 (–9,8...–3,1)	<0,001
39	41 (11,3)	17 (2,9)	–8,4 (–12,1...–4,7)	<0,001
45	37 (10,2)	37 (6,2)	–3,9 (–7,8...0)	0,037
51	51 (14)	63 (10,6)	–3,4 (–8...1,2)	0,142
52	51 (14)	48 (8,1)	–5,9 (–10,3...–1,5)	0,005
56	58 (15,9)	54 (9,1)	–6,8 (–11,5...–2,2)	0,002
58	38 (10,4)	20 (3,4)	–7,1 (–10,7...–3,4)	<0,001
59	23 (6,3)	16 (2,7)	–3,6 (–6,7...–0,6)	0,01
66	Не определялся Not determined	23 (3,9)	Нет No	Нет No
68	Не определялся Not determined	12 (2,0)	Нет No	Нет No

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

Примечание. ВПЧ – вирус папилломы человека; ДИ – доверительный интервал.

Note. HPV, human papillomavirus; CI, confidence interval.

Известно, что инфицирование несколькими генотипами ВПЧ ВКР значительно повышает риск развития патологии ШМ [19]. В исследовании Р. Уи с соавт. [20] показано достоверное увеличение вероятности возникновения ЦИН при одновременном инфицировании ВПЧ 16 и 18 генотипов. По нашим данным разные генотипы

Таблица 4. Распределение частоты обнаружения моногенотипов и множественных генотипов вируса папилломы человека (ВПЧ)

Table 4. Distribution of detection frequency of mono- and multiple human papillomavirus (HPV) genotypes

Число генотипов ВПЧ Number of HPV genotypes	n (%)
1	466 (78,6)
2	86 (14,5)
3	28 (4,7)
4	6 (1,0)
≥5	7 (1,2)
Всего / Total	593 (100)

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

ВПЧ встречались как в виде моногенотипов, так и в сочетании (табл. 4). Один генотип ВПЧ был обнаружен с наибольшей частотой (78,6%), четыре генотипа – у 6 пациенток (1%). Сочетание двух генотипов ВПЧ обнаружено у 86 пациенток (14,5%), три и более генотипов – у 41 пациентки (6,9%).

Анализ результатов ПЦР указал на статистически значимую разницу частоты обнаружения моногенотипов ВПЧ у обследованных женщин в возрастных группах 25–29 лет (87,9%), 30–34 года (82,1%) и 35–39 лет (84,8%) (табл. 5). Один генотип ВПЧ чаще всего был характерен для женщин раннего репродуктивного возраста. Инфицированность двумя и тремя генотипами ВПЧ чаще встречалась в возрастных группах 40–44 года (20,8 и 7,5% соответственно, $p=0,005$) и 18–24 года (18,5 и 6,9% соответственно, $p=0,005$). Более четырех генотипов ВПЧ обнаруживали у женщин в возрастных группах 18–24 и 30–34 года – 5,3 и 3,6% соответственно. Одновременное наличие нескольких генотипов ВПЧ ВКР в позднем репродуктивном возрасте не встречалось. Тест линейно-линейной ассоциации показал, что изменения числа генотипов

Таблица 5. Распределение частоты встречаемости моногенотипов и множественных генотипов вируса папилломы человека (ВПЧ) в разных возрастных группах**Table 5.** Frequency distribution of mono- and multiple human papillomavirus (HPV) genotypes in different age groups

Число генотипов ВПЧ ^a <i>Number of HPV genotypes^a</i>	Возрастная группа, % / <i>Age group, %</i>					
	18–24	25–29	30–34	35–39	40–44	45–49
1	69,3	87,9	82,1	84,8	71,7	77
2	18,5	9,1	13,1	12,1	20,8	16,4
3	6,9	3	1,2	3	7,5	6,6
≥4	5,3	0	3,6	0	0	0
<i>n</i>	189	99	84	66	53	61

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

^a *n*=593.**Таблица 6.** Распределение генотипов вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) в г. Гомеле и Гомельском районе в 2022–2023 гг.**Table 6.** Distribution of high-risk human papillomavirus (hrHPV) genotypes in Gomel and Gomel district for 2022–2023

Генотипы ВПЧ <i>HPV genotypes</i>	Все женщины ^a <i>All women^a</i> <i>n (%)</i>	Женщины репродуктивного возраста ^b <i>Women of reproductive age^b</i> <i>n (%)</i>
16	9 (3,8)	9 (4,2)
18	1 (0,4)	0
16, 18	1 (0,4)	1 (0,5)
16 и другие / <i>and others</i>	13 (5,5)	13 (6)
18 и другие / <i>and others</i>	3 (1,3)	2 (0,9)
16, 18 и другие / <i>and others</i>	1 (0,4)	1 (0,5)
Другие / <i>Others</i>	39 (16,5)	34 (15,9)
Всего / <i>Total</i>	67 (28,4)	60 (28)

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

^a *n*=236.^b *n*=214.

направленные, то есть имеет место снижение числа случаев обнаружения множественных генотипов с увеличением возраста пациенток ($p=0,005$).

Следовательно, наибольшая частота встречаемости как моногенотипов ВПЧ, так и их сочетаний характерна для женщин репродуктивного возраста. Это следует учитывать при проведении профилактических осмотров с целью раннего обнаружения возможной предопухолевой патологии ШМ, ассоциированной с ВПЧ ВКР.

Анализ структуры и частоты инфицированности ВПЧ обследованных женщин из г. Гомеля и Гомельского района показал, что ВПЧ ВКР обнаружен у 67 из 236 женщин (28,4%), а у женщин репродуктивного возраста – у 60 из 214 (28,0%) (табл. 6).

В отношении встречаемости моногенотипов ВПЧ или их сочетаний продемонстрировано, что у женщин в общей популяции и у женщин репродуктивного возраста с наибольшей частотой выявлялись ВПЧ 16 генотипа, сочетания ВПЧ

16 генотипа с другими генотипами ВПЧ и другие генотипы ВПЧ. Следует отметить, что у 55,3% женщин репродуктивного возраста (г. Гомель и Гомельский район) встречалось инфицирование одним генотипом ВПЧ (табл. 7). Два генотипа ВПЧ обнаружены в 16,4%, три и более – в 28,4% случаев.

Максимальная частота встречаемости (87,5%) одного генотипа ВПЧ была зарегистрирована в возрастной группе 30–34 года (табл. 8). Сочетание двух генотипов ВПЧ встречалось у 42,9% женщин в возрасте 18–24 года. Три генотипа ВПЧ с одинаковой частотой 14,3% выявлялись в группах 18–24 года, 35–39 лет и в группе ≥50 лет. Четыре и более генотипа ВПЧ преобладали в группах 35–39 лет (28,6%), 40–44 года (30,8%) и ≥50 лет (28,6%). Согласно опубликованным данным [21], сочетание ВПЧ 16 и 31 генотипов чаще приводит к персистирующей инфекции ВПЧ и более длительным срокам элиминации вируса [21], а также связано

Таблица 7. Распределение частоты обнаружения моногенотипов и множественных генотипов вируса папилломы человека (ВПЧ) в г. Гомеле и Гомельском районе

Table 7. Distribution of detection frequency of mono- and multiple human papillomavirus (HPV) genotypes in Gomel and Gomel district

Число генотипов ВПЧ Number of HPV genotypes	n (%)
1	37 (55,3)
2	11 (16,4)
3	7 (10,4)
4	5 (7,5)
≥5	7 (10,4)
Всего / Total	67 (100)

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

с тяжелыми поражениями [22]. В метаанализе А.Ф. Росича с соавт. [23] продемонстрирована высокая склонность к персистенции при сочетании ВПЧ 16, 31, 33 и 52 генотипов.

У некоторых пациенток (г. Гомель и Гомельский район) встречалось сочетание ВПЧ генотипов 16 и 31, 16 и 33, 16 и 56, 16 и 51; отмечены изоляты, в которых обнаружен ВПЧ 16 генотипа в сочетании с несколькими другими генотипами, например с 31, 33, 56 и 51 одновременно. Учитывая данные А.Ф. Росича с соавт. [23], можно предположить, что персистенция вируса у этих пациенток в течение длительного времени будет независимым фактором риска возникновения предопухолевой патологии и РШМ.

Ранжирование генотипов ВПЧ ВКР по распространенности показало, что из 45,4% всех случаев на ВПЧ 16 генотипа приходится 17%, ВПЧ 51 – 7,8%, ВПЧ 58 – 7,8%, ВПЧ 68 – 7,1%, ВПЧ 52 – 5,7%. Обнаруженные генотипы ВПЧ можно распределить

по частоте встречаемости в следующем порядке: 16>51=58>68>52>18=39=56=82>31=66=53=31>33>45=59. Следовательно, 16, 51 и 58 генотипы ВПЧ были преобладающими у обследованных женщин из г. Гомеля и Гомельского района.

Обнаруженные генотипы ВПЧ с учетом филогенетической классификации можно распределить следующим образом: в четырех районах Гомельской области доминировали группы ВПЧ ВКР α9, α7, α6 и α5, а в г. Гомеле и Гомельском районе – группы α9 (39,7%) и α7 (22,7%), которые, по данным МАИР, обладают наибольшим канцерогенным потенциалом (рис. S1, опубликован на сайте журнала⁴). В районах Гомельской области группа α9 (79,8%) была представлена ВПЧ 16 (50,1%), 31 (8,9%), 33 (6,9%), 35 (2,4%), 52 (8,1%) и 58 (3,4%) генотипов, группа α7 (28,6%) – ВПЧ 18 (14,8%), 39 (2,9%), 45 (6,2%), 59 (2,7%), 68 (2%) генотипов, группа α6 (13%) – ВПЧ 56 (9,1%) и 66 (3,9) генотипов, группа α5 (10,6%) – ВПЧ 51 генотипа. В г. Гомеле с убывающей частотой встречались филогенетические группы α6 (13,6%) и α5 (12,8%). Группа α9 включала ВПЧ 16 (17%), 31 (4,3%), 33 (3,5%), 35 (1,4%), 52 (5,7%) и 58 (7,8%) генотипов, группа α7 – ВПЧ 18 (5%), 39 (5%), 45 (2,8%), 59 (2,8%), 68 (7,1%) генотипов, группа α6 – ВПЧ 53 (4,3%), 56 (5%) и 66 (4,3%) генотипов, а группа α5 – ВПЧ 51 (7,8%) и 82 (5%) генотипов.

В Республике Беларусь с 2025 г. планируется внедрение программы вакцинации девочек в возрасте 11 лет против ВПЧ, которая включена в национальный календарь прививок⁵. Прогнозируется ее успешность в профилактике предраковых заболеваний в Гомельской области. Согласно рекомендациям ВОЗ, вакцинопрофилактика папилломавирусной инфекции должна быть внедрена в национальные календари всех

Таблица 8. Частота распределения множественных генотипов вируса папилломы человека (ВПЧ) в разных возрастных группах пациенток в г. Гомеле и Гомельском районе

Table 8. Frequency distribution of multiple human papillomavirus (HPV) genotypes in different age groups of patients in Gomel and Gomel district

Число генотипов ВПЧ ^a Number of HPV genotypes ^a	Возрастная группа, % / Age group, %						
	18–24	25–29	30–34	35–39	40–44	45–49	≥50
1	28,5	66,7	87,5	57,1	30,8	77,8	42,8
2	42,9	22,2	0	0	30,8	11,1	14,3
3	14,3	0	12,5	14,3	7,6	11,1	14,3
≥4	14,3	11,1	0	28,6	30,8	0	28,6
n	7	9	8	14	13	9	7

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

^a n=141 генотип ВПЧ, обнаруженный у 67 пациенток / HPV genotypes detected in 67 patients.

⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-332-342-fig-s1>

⁵ Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.07.2024 № 111. https://minzdrav.gov.by/upload/lcfiles/постановление_M3_2024_111.pdf

стран мира⁶. В исследованиях последних лет обсуждается вопрос, что двух- и четырехвалентная вакцины обеспечивают защиту от инфицирования и развития предраковых заболеваний, обусловленных ВПЧ родственных генотипов (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), не входящих в состав вакцин, то есть формируется перекрестный иммунитет [24, 25]. Однако перекрестная защита двух- и четырехвалентных вакцин является частичной и со временем ослабевает, что нужно учитывать при проведении специфической профилактики [25].

Полученные нами данные по Гомельской области в полной мере отражают распространенность и генотипический пейзаж ВПЧ ВКР в регионе в целом и распределение генотипов ВПЧ в разных возрастных группах, а также являются компонентом стратегии профилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний. В будущем это даст возможность оценить влияние программы вакцинации на проблему ВПЧ-инфекции в регионе.

ВЫВОДЫ

1. Частота встречаемости ВПЧ ВКР в общей популяции женщин Гомельской области составила 9%, женщин репродуктивного возраста – 9,7%. Более высокая частота встре-

чаемости ВПЧ ВКР отмечена у женщин раннего репродуктивного возраста 18–24 года – 18,8% (95% ДИ 16,8–20,9), 25–29 лет – 12,1% (95% ДИ 10,3–14,1), 30–34 года – 9,2% (95% ДИ 7,8–10,7). Частота встречаемости ВПЧ ВКР снижалась у женщин позднего репродуктивного возраста и ≥50 лет.

2. В настоящее время в Гомельской области наиболее распространены ВПЧ ВКР 16 (52,2%), 18 (15,1%), 51 (18,9%), 56 (9,8%) и 31 (9,7%) генотипов. Среди филогенетических групп доминируют группы α9 (16 и 31 генотип), α7 (18 генотип), α5 (51 генотип) и α6 (56 генотип), которые по классификации МАИР отнесены к 1 группе (наибольший канцерогенный потенциал). По результатам сравнительного анализа установлены изменения структуры доминирующих генотипов ВПЧ ВКР в Гомельской области за последние 10 лет.
3. Не выявлены статистически значимые региональные особенности в пейзаже и распространности генотипов ВПЧ по четырем районам Гомельской области и г. Гомеля. С учетом разного территориального расположения районов, в которых проводился скрининг ВПЧ ВКР, полученные результаты можно экстраполировать на Гомельскую область в целом.

Литература/References

1. Reuschenbach M, Valente S, Takyar J, et al. Treatment characteristics, HPV genotype distribution and risk of subsequent disease among women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia in Europe: A systematic literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2024;300:129–40. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2024.06.030>
2. Wang X, Huang X, Zhang Y. Involvement of human papillomaviruses in cervical cancer. *Front Microbiol.* 2018;9:2896. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02896>
3. Correa RM, Baena A, Valls J, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes by severity of cervical lesions in HPV screened positive women from the ESTAMPA study in Latin America. *PLoS One.* 2022;17(7):e0272205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272205>
4. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2012;100(Pt B):1–441. PMID: [23189750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23189750/)
5. Arbyn M, Tommasino M, Depuydt C, Dillner J. Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer? *J Pathol.* 2014;234(4):431–5. <https://doi.org/10.1002/path.4424>
6. Burd EM. Human papillomavirus laboratory testing: the changing paradigm. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(2):291–319. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-15>
7. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, et al. Classification and evolution of human papillomavirus genome variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61). *Virology.* 2018;516:86–101. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.002>
8. Baba SK, Alblooshi SSE, Yaqoob R, et al. Human papilloma virus (HPV) mediated cancers: an insightful update. *J Transl Med.* 2025;23:483. <https://doi.org/10.1186/s12967-025-06470-x>
9. Obeid DA, Almatrouk SA, Alfageeh MB, et al. Human papillomavirus epidemiology in populations with normal or abnormal cervical cytology or cervical cancer in the Middle East and North Africa: A systematic review and meta-analysis. *J Infect Public Health.* 2020;13(9):1304–13. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.012>
10. Chemaitelly H, Finan RR, Racoubian E, et al. Estimates of the incidence, prevalence, and factors associated with common sexually transmitted infections among Lebanese women. *PLoS ONE.* 2024;19(4):e0301231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0301231>
11. Han S, Lin M, Liu M, et al. Prevalence, trends, and geographic distribution of human papillomavirus infection in Chinese women: a summative analysis of 2,728,321 cases. *BMC Med.* 2025;23:158. <https://doi.org/10.1186/s12916-025-03975-6>
12. Okoye JO, Chukwukelu CF, Okekpa SI, et al. Racial disparities associated with the prevalence of vaccine and non-vaccine HPV types and multiple HPV infections between Asia and Africa: A systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2021;22(9):2729–41. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.9.2729>
13. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: Meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010;202(12):1789–99. <https://doi.org/10.1086/657321>
14. Osmani V, Hörner L, Nkurunziza T, et al. Global prevalence of cervical human papillomavirus in women aged 50 years and older with normal cytology: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2025;6(1):100955. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.100955>
15. Berza N, Zodzika J, Kivite-Urtane A, et al. Understanding the high-risk human papillomavirus prevalence and associ-

⁶ [https://www.who.int/news/item/11-04-2022-one-dose-human-papillomavirus-\(hpy\)-vaccine-offers-solid-protection-against-cervical-cancer](https://www.who.int/news/item/11-04-2022-one-dose-human-papillomavirus-(hpy)-vaccine-offers-solid-protection-against-cervical-cancer)

- ated factors in the European country with a high incidence of cervical cancer. *Eur J Public Health*. 2024;4(34):826–32. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckae075>
16. Баранов АА, Плакида АВ, Намазова-Баранова ЛС и др. Анализ экономического и социально-демографического бремени ВПЧ-ассоциированных заболеваний и экономической эффективности вакцинации против ВПЧ в России. *Педиатрическая фармакология*. 2019;16(2):101–10. Baranov AA, Plakida AV, Namazova-Baranova LS, et al. Analysis of the economic and socio-demographic burden of HPV-associated diseases and the cost-effectiveness of HPV vaccination in Russia. *Pediatric pharmacology*. 2019;16(2):101–10 (In Russ.). <https://doi.org/10.15690/pf.v16i2.2007>
 17. Беляковский ВН, Воропаев ЕВ. Папилломавирусная инфекция и рак шейки матки. *Проблемы здоровья и экологии*. 2006;4(4):18–23. Beliakouski VN, Voropaev EV. Human papillomavirus infection and cervical cancer. *Health and Ecology Issues*. 2006;4(4):18–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2006-3-4-3>
 18. Волченко АН. Генотипирование папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска. В кн.: *Молодежь в науке – 2011: материалы Международной научной конференции молодых ученых, Минск, 25–29 апр. 2011 г.: приложение к журн. «Весті Національної академії наук України. Серія біол. і мед. наук»*. Ч. 3. Минск: Беларуская навука; 2012. С. 241–6. Volchenko AN. Genotyping of papillomavirus infection of high carcinogenic risk. In: *Youth in Science – 2011: Proceedings of the International Scientific Conference of Young Scientists, Minsk, April 25–29, 2011: Supplement to the journal "Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological and Medical Series"*. Part 3. Minsk: Belarusian Science; 2012. P. 241–6 (In Russ.).
 19. Na J, Li Y, Wang J, et al. The correlation between multiple HPV infections and the occurrence, development, and prognosis of cervical cancer. *Front Microbiol*. 2023;14:1220522. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1220522>
 20. Wu P, Xiong H, Yang M, et al. Co-infections of HPV16/18 with other high-risk HPV types and the risk of cervical carcinogenesis: A large population-based study. *Gynecol Oncol*. 2019;155(3):436–43. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.10.003>
 21. Туранова ОВ, Белокриницкая ТЕ, Белозерцева ЕП, Авраченко АВ. ВПЧ-инфекция: проспективное наблюдение элиминации и оценка факторов риска персистенции. *Доктор.Ру*. 2019;4(159):31–5. Turanova OV, Belokrinitskaya TE, Belozertseva EP, Avrachenkova AV. HPV infection: prospective observation of elimination and assessment of risk factors for persistence. *Doctor.Ru*. 2019;4(159):31–5 (In Russ.). <https://doi.org/10.31550/1727-2378-2019-159-4-31-35>
 22. Auvray C, Douvier S, Caritey O, et al. Relative distribution of HPV genotypes in histological cervical samples and associated grade lesion in a women population over the last 16 years in Burgundy, France. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1224400. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1224400>
 23. Rositch AF, Gravitt PE, Smith JS. Growing evidence that HPV infection is associated with an increase in HIV acquisition: exploring the issue of HPV vaccination. *Sex Transm Infect*. 2013;89(5):357. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2012-050870>
 24. Zhao M, Zhou D, Zhang M, et al. Characteristic of persistent human papillomavirus infection in women worldwide: a meta-analysis. *PeerJ*. 2023;11:e16247. <https://doi.org/10.7717/peerj.16247>
 25. Brown DR, Joura EA, Yen GP, et al. Systematic literature review of cross-protective effect of HPV vaccines based on data from randomized clinical trials and real-world evidence. *Vaccine*. 2021;39(16):2224–36. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.076>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликован рисунок S1.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-332-342-fig-s1>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **О.П. Логина** — концепция и дизайн исследования, обзор публикаций по теме статьи, сбор материала, статистическая обработка результатов и их изложение, работа с иллюстративным материалом, подготовка разделов «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Литература». **Н.И. Шевченко**, **А.В. Воропаева** — редактирование текста рукописи; **Е.Л. Гасич** — планирование исследования, критическое обсуждение текста рукописи и утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено на заседании биоэтической комиссии государственного учреждения «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека», протокол заседания № 2 от 20.12.2018.

Additional information. Figure S1 is published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-332-342-fig-s1>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **V.P. Lohinava** conceptualised and designed the study, reviewed similar publications, collected material, processed statistical data, presented the results, worked with illustrative material, drafted the “Results and Discussion”, “Conclusions”, and “References” sections. **N.I. Shevchenko**, **A.V. Voropayeva** edited the manuscript. **E.L. Gasich** planned the study, critically discussed the manuscript and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was approved by the Bioethics Committee at the Republican Scientific and Practical Centre of Radiation Medicine and Human Ecology of 20.12.2018 (Meeting Minutes No. 2).

Об авторах / Authors

Логина Ольга Павловна / Volha P. Lohinava

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7189-3799>

Шевченко Наталья Ивановна, канд. биол. наук, доц. / Natalia I. Shevchenko, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0579-6215>

Воропаева Алла Викторовна, канд. биол. наук, доц. / Alla V. Voropayeva, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0213-2421>

Гасич Елена Леонидовна, д-р биол. наук, доц. / Elena L. Gasich, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3662-3045>

Поступила 14.05.2025

После доработки 09.07.2025

Принята к публикации 12.09.2025

Received 14 May 2025

Revised 9 July 2025

Accepted 12 September 2025

УДК 615.035:615.038:615.012.8

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-343-356>

Обзор | Review



Экзосомы, продуцируемые мезенхимальными стромальными клетками, для терапии острого респираторного дистресс-синдрома: обзор доклинических и клинических исследований

А.И. Куралесова, А.Г. Грошева, Е.Н. Генкина, И.Б. Есмагамбетов 

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098,
Российская Федерация

✉ Есмагамбетов Ильяс Булатович; esmagambetov@gamaleya.org

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В период пандемии COVID-19 диагноз острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) констатировали у 15–33% пациентов, госпитализированных с заболеваниями легких. Вследствие возросших показателей больничной летальности и недостаточной эффективности существовавших на тот момент лекарственных средств возникла необходимость применения терапии мезенхимальными стромальными клетками (МСК). Содержащиеся в секрете МСК экзосомы обладают регенеративной активностью, как и МСК, причем введение последних может быть сопряжено с риском тромбообразования. Обнадёживающие результаты доклинических испытаний препаратов на основе экзосом обуславливают их клиническое применение. Анализ актуальных данных по безопасности и эффективности инновационных препаратов на основе экзосом позволит выработать протоколы получения, хранения, транспортировки, а также оптимальные схемы применения препаратов для бесклеточной терапии ОРДС и других заболеваний легких.

ЦЕЛЬ. Анализ результатов доклинических и клинических исследований безопасности и эффективности препаратов на основе экзосом, продуцируемых МСК и предназначенных для бесклеточной терапии ОРДС и других заболеваний легких в качестве альтернативы медикаментозному лечению.

ОБСУЖДЕНИЕ. Экзосомы, важнейший компонент секретомов различных клеток, осуществляют горизонтальный перенос генетической информации и биологически активных молекул. В доклинических испытаниях установлено, что полученные из секрета МСК экзосомы обладают выраженными регенеративными свойствами, схожими с МСК, и имеют ряд преимуществ: малые размеры, исключающие тромбообразование в легочных капиллярах; проникновение через гематоэнцефалический барьер; отсутствие тератогенности; обеспечение обмена эпигеномной информацией при межклеточных взаимодействиях. Введение препаратов на основе экзосом способствует регенерации поврежденной легочной ткани при ОРДС и других заболеваниях легких. Клинические исследования подтвердили безопасность и эффективность препаратов при ингаляционном, внутривенном или сочетанном введении. Эффективность препаратов может быть повышена при совместном применении экзосом с МСК или при использовании экзосом, обогащенных гликопротеином CD24 (ключевая молекула врожденного иммунитета). Препараты на основе экзосом купируют ОРДС и другие заболевания легких благодаря своей регенеративной и иммуномодулирующей активности, а также способности снижать уровень «цитокинового шторма» и апоптоза и рассматриваются как перспективная бесклеточная (cells free) терапевтическая стратегия в лечении ОРДС.

© А.И. Куралесова, А.Г. Грошева, Е.Н. Генкина, И.Б. Есмагамбетов, 2025

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Проведенный анализ данных доклинических и клинических исследований свидетельствует о высокой эффективности терапевтического действия препаратов на основе экзосом, однако целесообразны дальнейшие исследования безопасности препаратов и определения оптимальных схем лечения ОРДС.

Ключевые слова: ОРДС; острый респираторный дистресс-синдром; МСК; мезенхимальные стромальные клетки; экзосомы; экзосомальная терапия; везикулы; доклинические исследования; клинические исследования; регенерация; врожденный иммунитет; COVID-19; секретом

Для цитирования: Куралесова А.И., Грошева А.Г., Генкина Е.Н., Есмагамбетов И.Б. Экзосомы, продуцируемые мезенхимальными стромальными клетками, для терапии острого респираторного дистресс-синдрома: обзор доклинических и клинических исследований. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):343–356. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-343-356>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России «Разработка технологической платформы на основе экзосом, продуцируемых костно-мозговыми мезенхимальными стволовыми клетками человека, для создания средств терапии острого респираторного дистресс-синдрома», регистрационный номер 1023022100011-3.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Mesenchymal stromal cell-derived exosomes for acute respiratory distress syndrome treatment: A review of preclinical and clinical trials

Albina I. Kuralesova, Alla G. Grosheva, Elena N. Genkina, Ilias B. Esmagambetov✉

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

✉ Ilias B. Esmagambetov; esmagambetov@gamaleya.org

ABSTRACT

INTRODUCTION. During the COVID-19 pandemic, acute respiratory distress syndrome (ARDS) was diagnosed in 15–33% of patients hospitalised for pulmonary diseases. Hospital mortality rates increased. The existing medicinal products lacked effectiveness. Thus unconventional treatment methods were needed, such as mesenchymal stromal cell (MSC) therapy. The risk of blood clotting in the lung vessels after MSC injection made exosomes from MSC secretome a therapy of choice. Exosomes cross the blood-brain barrier and have regenerative effect similar to that of MSC. The promising results of preclinical trials for exosome-based drugs have stimulated their clinical use. Analysing their safety and effectiveness will allow us to develop protocols for their production, storage, and transportation, as well as optimal dose regimens for cell-free therapy of ARDS and other pulmonary diseases.

AIM. This study aimed to analyse performed preclinical and clinical studies on safety and efficacy of MSC-derived exosome drugs intended for cell-free ARDS therapy and other pulmonary diseases as an alternative to drug therapy.

DISCUSSION. Exosomes, the most important secretome element in various cells, carry out horizontal transfer of genetic information and bioactive molecules. Animal models show that exosomes obtained from MSC secretome have regenerative abilities similar to MSC and offer various advantages: small size excluding blood clotting in the pulmonary capillaries; ability to penetrate blood-brain barrier, non-teratogenicity, and exchange of epigenomic information in cell-cell interactions. Preclinical *in vivo* studies have shown that exosomes affect regeneration of damaged lung tissue in ARDS and other lung diseases. Clinical trials have confirmed safety and effectiveness of inhalation, intravenous or combined administration. Drug effectiveness can be increased by combining exosomes with MSC or enriching them with CD24 (key molecule of innate immunity). Due to regenerative, immunomodulatory properties of exosomes, their ability to reduce the level of cytokine storm and apoptosis, they are used to treat ARDS and

other lung diseases. Exosome preparations reverse ARDS and other diseases due to their regenerative and immunomodulatory effect, and ability to reduce cytokine storm and apoptosis. Thus exosomes are recognised as a new effective cell-free therapy.

CONCLUSIONS. Therapeutic effect of exosome-based preparations was analysed in experimental, preclinical, and clinical trials; however, further trials are required to determine ARDS safety and optimal treatment regimens.

Keywords:

ARDS; acute respiratory distress syndrome; MSCs; mesenchymal stem cells; exosomes; exosomal therapy; vesicles; preclinical trials; clinical trials; regeneration; innate immunity; COVID-19; secretome

For citation:

Kuralesova A.I., Grosheva A.G., Genkina E.N., Esmagambetov I.B. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes for acute respiratory distress syndrome treatment: A review of preclinical and clinical trials. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):343–356. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-343-356>

Funding. The study was carried out as a part of the State Assignment of the Federal State Budgetary Institution National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation "Development of a technological platform based on exosomes produced by human bone marrow mesenchymal stem cells to obtain therapeutics for the treatment of acute respiratory distress syndrome", registration No. 1023022100011-3.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время приобретает актуальность исследование стратегий лечения острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), который развивается вследствие различных причин (бактериальные или вирусные пневмонии, сепсис, травмы грудной клетки, отравление газами и др.) [1]. ОРДС – воспалительное альвеолярное поражение легких, характеризующееся повышением проницаемости альвеолокапиллярной мембраны. При этом формируется некардиогенный отек легких, снижается количество вентилируемых альвеол как следствие отсутствия сурфактанта [2, 3]. По мере развития воспалительного процесса возникает реакция иммунной системы по типу «цитокинового шторма», выделение провоспалительных цитокинов, биологически активных веществ в отношении сосудистой стенки, клеток – эффекторов субстанций, приводящих к повреждению альвеолоцитов и эндотелиоцитов, появлению аутореактивных клонов плазматических клеток, разрушающих клетки эпителия, и экссудативному воспалению, вследствие чего повышается летальность [4]. При развитии цитокинового шторма патогенез ОРДС быстро достигает наибольшей выраженности, что ведет к нарушению функционирования механизмов цитотоксичности клеток. ОРДС плохо поддается неспецифическому лечению. В клиниках часто ограничиваются предотвращением некардиогенного отека, используют различные методы вентилиации легких, оксигенации для уменьшения гипоксии и другие методы купирования полифункциональной недостаточности.

Н. Ху с соавт. обратили внимание на то, что изменчивость результатов применения терапии в клинике обусловлена существованием двух типов ОРДС: первичного – «легочного» и вторичного – «внелегочного», который, в свою очередь, разделен на два подтипа. Деление ОРДС на группы и подгруппы основано на клинических, биологических, рентгенологических и генетических критериях и необходимо для определения фенотипа ОРДС и выбора стратегии эффективного лечения пациентов [5]. До сих пор не хватает специфических лекарственных препаратов (гормоны, антибиотики, сурфактанты), которые при этом недостаточно эффективны и не приводят к полноценному восстановлению легких.

По данным Росстата¹, с 2010 по 2019 гг. в России отмечался рост первичной заболеваемости бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). С конца 2019 г. ОРДС констатировали у 15–33% пациентов, госпитализированных с диагнозом COVID-19, что увеличило социальную и экономическую нагрузку на отделения интенсивной терапии. Разрушительное воздействие ОРДС на организм можно сравнить с последствиями злокачественных опухолей, СПИДа, обширного инфаркта [6, 7]. Были предприняты попытки использовать в лечебных целях сыворотку переболевших пациентов (реконвалесценты) и специфических антител [8]. Определенные успехи были достигнуты при применении КОВИД-глобулина. Результаты проведенных исследований показали, что «эффективность КОВИД-глобулина в дозе 1 мл/кг на фоне применения стандартной терапии превосходит

¹ <https://rosstat.gov.ru/statistic>

эффективность плацебо при лечении пациентов со среднетяжелым течением COVID-19» [9]; «назначение КОВИД-глобулина рекомендовано в дозе 1 мл/кг по принципу «чем раньше, тем лучше», но не позже 7 сут заболевания, однако противопоказано при развившемся цитокиновом шторме ранее 7 сут заболевания» [9].

Новым этапом лечения заболеваний, плохо поддающихся воздействию стандартными лекарственными препаратами, стало применение клеточной терапии. Открытие стволовых мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в костном мозге (КМ) [10], жировой и других тканях [11], разработка метода получения диплоидных штаммов этих полипотентных клеток [12], изучение их дифференцировочной потенции [13] создали возможность использования МСК для восстановления поврежденных тканей [14]. Положительные результаты доклинических экспериментов обусловили трансляцию клеточной терапии в клиническую практику. На основе МСК были разработаны несколько методов для лечения заболеваний костно-мышечной системы (остеопороз) [15], аллергических [16], неврологических (болезнь Паркинсона) [17], онкологических (инвазивный рак мочевого пузыря) [18] и других заболеваний [19]. Был создан препарат NestCell® для лечения пациентов с тяжелой формой пневмонии, вызванной COVID-19² [20].

В предыдущие годы результаты экспериментов на животных [21, 22] и результаты клинических исследований [23–25] продемонстрировали, что МСК и секретом культур МСК³ могут значительно снизить воспалительный процесс и связанные с ним патологические нарушения, вызванные COVID-19 и другими инфекционными заболеваниями легких. Регенерация поврежденной ткани легких при введении МСК происходит за счет трансдифференцировки стволовых клеток и за счет паракринного/гормонального влияния, направленного на активацию выработки противовоспалительных цитокинов. Последний механизм считается доминирующим [20, 26].

Терапия на основе МСК имеет некоторые существенные недостатки: низкую стабильность препаратов, риск тромбоэмболии легочной артерии и опухолеобразования и др. [27, 28]. Установлено, что экзосомы, выделенные из МСК, обладают такими же противовоспалительными и регенеративными свойствами, как и сами клетки [29]. Преимущества экзосом заключаются в гистосовместимости, низкой иммуногенности и онкогенности, простоте хранения и высокой

стабильности. Экзосомы обеспечивают направленную доставку лекарств в клетки реципиентов. Открытие экзосом, выделенных из секрета культивируемых МСК, стало многообещающей перспективой в лечении многих тяжелых заболеваний, в том числе и ОРДС, а также позволило применять экзосомы вместо МСК [30, 31].

Экзосомы, присутствующие во всех клетках, тканях и жидкостях организма, представляют собой наночастицы размером 50–100 нм, покрытые мембраной из липидного бислоя со связанными с ней молекулами клеточной адгезии. Экзосомы имеют ряд преимуществ перед МСК, повышающих эффективность и безопасность их применения: малые размеры; низкую иммуногенность; выраженные регенеративные свойства; отсутствие туморогенности; способность проникать через гематоэнцефалический барьер; низкий риск тромбообразования в легочных капиллярах. Экзосомы обеспечивают обмен эпигеномной информацией при межклеточных взаимодействиях. Терапевтическое действие экзосом опосредовано переносом мРНК, белков и рецепторов экзосом в поврежденные ткани [32]. К другим важным преимуществам экзосом можно отнести более простые по сравнению с МСК способы их получения и хранения при лиофилизации или глубокой заморозке, что обеспечивает качественную транспортировку без потери терапевтических свойств [33, 34].

Полученные из МСК экзосомы продемонстрировали лучший терапевтический эффект на доклинических моделях ОРДС. Введение экзосом в организм подавляло агрегацию макрофагов в легочной ткани, снижало секрецию IL-27 и уровни провоспалительных факторов и повышало выживаемость животных. Применение экзосом, полученных из МСК пуповинной крови человека, приводило к снижению уровней воспалительных факторов и окислительного стресса путем индукции аутофагии *in vivo* при остром повреждении легких, индуцированном липополисахаридами (ЛПС) [35]. Экзосомы МСК, полученные из ткани КМ, регулируя метаболическое состояние макрофагов посредством ингибирования гликолиза, подавляли поляризацию макрофагов M1, что способствовало поляризации макрофагов M2 в легочной ткани и улучшало состояние легких при ОРДС [36, 37].

Таким образом, к настоящему времени накоплен большой массив данных по применению препаратов на основе экзосом для лечения ОРДС, и систематизация этих данных позволит

² <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04315987>

³ Среда культивирования клеток, содержащая белковые молекулы, ростовые факторы, везикулы, в том числе экзосомы, выделяемые клетками в среду.

более предметно оценить проблемные вопросы и перспективы их применения.

Цель работы — анализ результатов доклинических и клинических исследований безопасности и эффективности препаратов на основе экзосом, продуцируемых МСК и предназначенных для бесклеточной терапии ОРДС и других заболеваний легких в качестве альтернативы медикаментозному лечению.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Доклинические исследования терапевтического действия экзосом

Анализ результатов экспериментов на животных указал на возможности терапевтического действия экзосом при воспалительных процессах различной этиологии. Н. Deng с соавт. [36] продемонстрировали, что МСК костного мозга (КМ), обладая мощными иммуномодулирующими и иммуносупрессивными свойствами вследствие секреции экзосом, улучшали состояние поврежденных сепсисом легких. Экзосомы снижали экспрессию генов, вовлеченных в гликолиз, путем ингибирования фактора транскрипции HIF-1 α . Интратрахеальное введение экзосом может быть эффективным способом лечения ЛПС-опосредованного ОРДС [36].

T.J. Morrison с соавт. [37] на модели ЛПС-опосредованного ОРДС у мышей установили, что внеклеточные везикулы из МСК КМ человека способствовали формированию противовоспалительного и высокофагоцитарного фенотипа макрофагов посредством передачи митохондрий. Модуляция функции макрофагов была связана с усилением окислительного фосфорилирования. Альвеолярные макрофаги после взаимодействия с внеклеточными везикулами МСК КМ человека снижали продукцию TNF- α и IL-8 на 58 $\pm$ 8% и 30 $\pm$ 15% соответственно, что уменьшало повреждение легких *in vivo* [37].

W. Xu с соавт. [38] установили, что введение экзосом, выделяемых эндотелиальными прогениторными клетками (endothelial progenitor cell, EPC), оказывало защитное действие на эндотелий капилляров легких и восстанавливало их целостность. Это приводило к уменьшению интерстициального отека и повреждений в легких крыс при ОРДС (гистологические данные). Культуру EPC получали следующим способом: выделенные из КМ мононуклеарные клетки центрифугировали в градиенте плотности. После культивирования в течение 7 сут клетки проявляли фенотип эндотелиальных, что следовало из поглощения ацетилированного липопротеина низкой плотности, связывания

эндотелиально-специфического лектина и высокой экспрессии гликопротеина CD31. Эти свойства клеток подтверждали их эндотелиальную природу [38].

A. Monsel с соавт. [39] представили результаты исследования влияния везикул МСК, полученных из КМ человека, на пневмонию у мышей, индуцированную ЛПС *Escherichia coli*. Внутривенное введение 90 мкл микровезикул МСК через 4 ч после воздействия на мышей ЛПС увеличивало 72-часовую выживаемость животных на 88% благодаря секреции фактора роста кератиноцитов. Терапия приводила также к снижению инфильтрации лейкоцитов на 40%, нейтрофилов — на 53%; снижению общей концентрации белка в бронхоальвеолярном лаваже — на 22% через 24 ч по сравнению с контрольной группой мышей, получавшей фосфатно-солевой буфер (PBS); уменьшению количества клеток воспалительного инфильтрата, цитокинов, белка и бактерий вследствие усиления фагоцитоза [39].

В доклиническом исследовании Н. Kaspi с соавт. [40] использовали препарат Ехо MSC-NTF (NurOwn®, Израиль). Для получения Ехо MSC-NTF клетки МСК КМ инкубировали в среде, содержащей 1 мМ дб-цАМФ, 20 нг/мл FGF2 человека, 5 нг/мл PDGF человека и 50 нг/мл герегулина β 1. На модели ЛПС-индуцированного воспаления легких у мышей терапевтический эффект при интратрахеальном введении Ехо MSC-NTF превосходил действие Ехо MSC в снижении проявлений ОРДС. Уровень оксигенации легких повышался на 10%, утолщение альвеолярных стенок — на 43%; количество IL-6 уменьшалось в 7 раз и TNF- α — в 2,3 раза; предотвращалось повреждение легочной ткани. Количество нейтрофилов в легочной ткани снижалось на 26%, накопление фибрина возвращалось к норме [38].

Компанией BrainStorm Cell Therapeutics получен патент⁴ на способ получения экзосом из МСК КМ взрослого человека.

В работе В.А. Ткачука с соавт. [41] отмечено, что на моделях блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей интратрахеальное введение обогащенной внеклеточными везикулами (ВВ) кондиционированной среды МСК (КС-МСК) способствовало разрешению фиброза. Мыши, которым вводили лекарственное средство, демонстрировали улучшение состояния по сравнению с контролем. Для оценки состояния животных использовали балльную систему. Медиана максимального накопленного балла у контрольных животных составляла 7, а у экспериментальных (введение КС-МСК, обогащенной ВВ) — 1, что говорило о более благополучном состоянии

⁴ <https://patents.google.com/patent/AU2019252987B2>

мышей, получивших КС-МСК, обогащенную ВВ. В группе профилактики фиброза медиана максимального накопленного балла у контрольных животных составляла 9, а у экспериментальных — 5. Получены данные по эффективности компонентов секрета МСК не только для лечения фиброза легочной ткани, но и его предотвращения, а также для профилактики развития фибротических осложнений интерстициальных пневмоний, в том числе вирусных, включая коронавирусные инфекции [41].

В исследовании S. Shapira с соавт. [42] оценивалась эффективность и безопасность EXO-mCD24 (мышинный гомолог EXO-CD24 человека) при средней и тяжелой степени ОРДС. Эффективность EXO-mCD24 изучалась на моделях воспалительных заболеваний у мышей. В состав препарата входят экзосомы, обогащенные гликопротеином mCD24 (cluster of differentiation 24), который является ключевой молекулой врожденного иммунитета. Получение препарата при трансфекции ExpiFectamine™ 293 / плазмидная ДНК в культуре клеток НЕК включало следующие стадии: 1) отбор культуральной жидкости, ее последующее центрифугирование и фильтрацию (размер пор фильтра 0,22 мкм); 2) преципитацию в присутствии 30% полиэтиленгликоля (ПЭГ) и 1,5 М натрия хлорида в течение 15–16 ч и центрифугирование при 4000 об/мин; 3) растворение осадка в физиологическом растворе, диализ в PBS; концентрирование раствора экзосом в PBS на фильтре с размером пор 100 кДа [42].

В работе S. Shapira с соавт. [43] исследовали токсичность, безопасность и терапевтическое действие EXO-mCD24 при ингаляционном пути введения препарата на модели ЛПС-индуцированной сливной пневмонии у мышей. 1×10^8 и 1×10^9 экзосом в физиологическом растворе вводили животным 1 раз/сут в течение 5 сут. У животных в контрольной и экспериментальной группах отсутствовали побочные эффекты или различия в поведении. При введении 1×10^8 экзосом EXO-mCD24 сохранялось повреждение легких средней и тяжелой степени, тогда как введение 1×10^9 экзосом приводило к выраженному улучшению состояния легких, заметному снижению уровней IL-6 (с 149 до 58 пг/мл), IL-12 (с 17 до 13 пг/мл), TNF- α (с 14 до 7 пг/мл), IFN- γ (с 42 до 11 пг/мл) в образцах сыворотки крови. В бронхоальвеолярном лаваже также наблюдалось снижение маркеров воспаления. Применение EXO-mCD24 продемонстрировало его эффективность и увеличение выживаемости животных по сравнению с контрольной группой: для групп животных, получивших 1×10^{10} и 1×10^{11} экзосом, отношение рисков составило

0,069 (95% ДИ 0,016–0,292) и 0,155 (95% ДИ 0,043–0,555) соответственно [43].

Основные данные по доклиническим испытаниям препаратов экзосом приведены в *таблице 1*.

Клинические исследования препаратов на основе экзосом

О. Green с соавт. [44] отмечали, что EXO-CD24 — многообещающее лекарственное средство не только для лечения ОРДС, но и тех многих заболеваний, в отношении которых не эффективны стандартные лекарственные препараты. На нескольких моделях заболеваний у животных (абдоминальный и легочный сепсис, легочный фиброз, астма, ХОБЛ и грипп) была доказана терапевтическая эффективность EXO-CD24 [44, 45].

На основании полученных результатов доклинических исследований EXO-CD24 S. Shapira с соавт. [42, 43] и О. Green с соавт. [44] предположили, что применение экзосомом, гиперэкспрессирующих CD24, можно экстраполировать на лечение заболеваний у людей. Это обусловило переход к клиническим исследованиям (КИ) безопасности и эффективности препаратов на основе экзосом для лечения ОРДС и других заболеваний. В рандомизированных КИ использовались препараты аллогенных экзосом, полученных из МСК разных тканей человека, которые вводили пациентам со средним или тяжелым течением ОРДС ингаляционно или внутривенно. В качестве плацебо в большинстве КИ использовался физиологический раствор.

S. Shapira с соавт. [42], получив мышинный гомолог CD24 (mCD24), разработали противовоспалительный препарат EXO-CD24 на основе экзосом, обогащенных гликопротеином CD24 — молекул, участвующих в формировании врожденного иммунитета. EXO-CD24 воздействует на гиперактивные клетки иммунной системы при COVID-19, ассоциированном с ОРДС. Показано, что CD24 связан с различными DAMP (молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждением), такими как белок 1 группы высокой подвижности (HMGB1), белки теплового шока и нуклеолины. Вследствие взаимодействия CD24 с SiglecG мыши или Siglec10 человека (sialic acid binding Ig-like lectin) избирательно подавляется реакция организма на повреждение тканей [46, 47].

Препараты на основе экзосом для ингаляционного введения

Препарат EXO-CD24

S. Shapira с соавт. [42] провели КИ (фаза Ib/IIa) препарата Exo-CD24 на 35 пациентах со средней и тяжелой формой COVID-19. Возрастающие

Таблица 1. Доклинические испытания препаратов экзосом на животных
Table 1. Preclinical trials of exosome preparations *in vivo*

Источник <i>Reference</i>	Экспериментальная модель <i>Experimental model</i>	Индукторы легочной патологии <i>Inductors of pulmonary pathology</i>	Описание препарата <i>Drug description</i>	Терапевтический эффект <i>Therapeutic effect</i>
[36]	C57Black/6, мыши, самцы <i>mice, males</i>	ЛПС <i>LPS</i>	Экзосомы МСК костного мозга <i>Bone marrow MSC exosomes</i>	Улучшение состояния легких посредством модуляции поляризации макрофагов и подавления в них гликолиза <i>Improving lung function by modulating macrophage polarisation and inhibiting glycolysis</i>
[37]	C57Black/6, мыши, самцы <i>mice, males</i>	ЛПС <i>LPS</i>	Внеклеточные везикулы МСК костного мозга <i>Bone marrow MSC extracellular vesicles</i>	Уменьшение повреждения легких путем формирования противовоспалительного и высокофагоцитарного фенотипа макрофагов <i>Reduction of lung damage by anti-inflammatory and highly phagocytic macrophage phenotype</i>
[38]	Крысы Спрег-Дуули <i>Sprague Dawley rats</i>	ЛПС <i>LPS</i>	Экзосомы эндотелиальных клеток <i>Endothelial cell exosomes</i>	Восстановление эндотелия капилляров легких <i>Endothelium recovery of the lung capillaries</i>
[39]	C57Black/6, мыши / <i>mice</i>	ЛПС <i>LPS</i>	Микровезикулы МСК костного мозга <i>Bone marrow MSC microvesicles</i>	Увеличение выживаемости животных <i>An increase in animal survival</i>
[40]	Мыши <i>Mice</i>	ЛПС <i>LPS</i>	Препарат компании Brainstorm ExoM-SC-NTF <i>Brainstorm company ExoMSC-NTF product</i>	Повышение уровня оксигенации легких, снижение количества воспалительных цитокинов <i>An increase in lung oxygenation, with reduced inflammatory cytokine levels</i>
[41]	Мыши <i>Mice</i>	Блеомицин <i>Bleomycin</i>	Секретом МСК, обогащенный внеклеточными везикулами <i>MSC secretome enriched with extracellular vesicles</i>	Разрешение фиброза, улучшение состояния животных по сравнению с контролем <i>Fibrosis resolving, improvement of animal health status compared to the control group</i>
[42]	Мыши <i>Mice</i>	ЛПС <i>LPS</i>	EXO-mCD24 на основе мышиных клеток <i>EXO-mCD24 based on mouse cells</i>	При высокой дозе 1×10^{10} экзосом — выраженное улучшение состояния легких и увеличение выживаемости животных <i>A significant improvement in lung status and an increase in animal survival at a high dose (1×10^{10}) of exosomes</i>

Таблица составлена авторами по данным литературы / The table is prepared by the authors using literature data

Примечание. ЛПС — липополисахарид; МСК — мезенхимальные стромальные клетки.
 Note. LPS, lipopolysaccharide; MSC, mesenchymal stromal cells.

дозы Ехо-CD24 (1×10^8 – 1×10^9 экзосом) вводили ингаляционно в течение 5 сут. Побочных эффектов, связанных с приемом препарата, не наблюдалось в течение 443–575 сут. Препарат эффективно снижал уровни провоспалительных маркеров и цитокинов. Так, уровни MIF3A, IL-17A, IL-1 β , IL-6, TGF- α , TNF- α и IL-1 α снижались на 4, 7 и 35-е сут наблюдения по сравнению с исходными уровнями (день 0); среднее значение уровня С-реактивного белка в крови составило $127,1 \pm 14,7$ мг/л ($\pm$ SEM⁵) в день 0 с дальнейшим его снижением до $66,6 \pm 10,4$ и $19,3 \pm 7,7$ мг/л на 3-е и 7-е сут соответственно [42].

I. Grigoropoulos с соавт. (Греция) [48] проведено КИ (фаза IIb) с целью подбора дозы препарата для лечения пациентов с ОРДС средней и тяжелой степени, вызванного COVID-19. Пациенты ($n=91$) получали 1×10^9 – 1×10^{10} экзосом EXO-CD24 в течение 5 сут. На 7-е сут оценивались эффективность и безопасность препарата; пациенты оставались под наблюдением в течение 28 сут⁶ [48].

A. Nimrod с соавт. (Израиль) исследовали препарат EXO-CD24 в группе 60 пациентов с ОРДС легкой и средней степени. Препарат экзосом (1×10^{10}) разводили в 1,5 мл физиологического

⁵ Стандартная ошибка среднего (standard error of the mean).

⁶ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04902183>

раствора для ингаляции и вводили с помощью стандартного струйного небулайзера 2 раза/сут в течение 5 сут⁷.

Проведенные КИ (фазы I и II) продемонстрировали отсутствие неблагоприятного воздействия на пациентов. Несмотря на уникальное сочетание экзосом (носитель) и CD24 (иммуномодулятор) в лекарственном препарате для ингаляционного введения, требуются дальнейшие его исследования на более многочисленной когорте пациентов.

Препарат haMSC-Exos (Mexcovid)

Препарат экзосом получали из МСК жировой ткани человека [49]. Клетки 4-го пассажа переносили в другой культуральный сосуд (клеточная фабрика) с плотностью $(1-1,5) \times 10^4$ /клеток/см² для получения нужной клеточной массы. По достижении 90% конфлюентности культур полную питательную среду (α -MEM, содержащая лизат тромбоцитов человека) заменяли на питательную среду без экзосом. Полную среду центрифугировали при 120000 g в течение 6 ч. Супернатант использовали в качестве среды, не содержащей экзосомы, для дальнейшего культивирования клеток и выделения экзосом. Супернатант после инкубации в течение 48 ч очищали от клеточного дебриса с помощью дифференциального центрифугирования, инкубировали с 12% ПЭГ в течение 24 ч и далее центрифугировали при 3000 g в течение 60 мин. Осадок суспендировали в PBS и центрифугировали при 120000 g в течение 70 мин [49].

Эффективность и безопасность ингаляционного введения препарата haMSCs-Exos (Mexcovid) в аэрозольной форме изучались в пилотном плацебо-контролируемом однокрупном КИ (фаза IIa), которое проводили в госпитале Ruijin Hospital (Китай), при лечении пациентов с тяжелым течением COVID-19. Семь пациентов ежедневно получали haMSCs-Exos в дозе 2×10^8 экзосом в течение 5 сут при ингаляционном введении препарата с помощью небулайзера. Все пациенты переносили лечение без проявления побочных эффектов при сохранении клинической стабильности. Отмечалась различная степень разрешения легочных поражений⁸ [50].

Препарат hMSC-Exos

hMSC-Exos — препарат на основе экзосом, полученных из МСК КМ человека по методике, изложенной Shi M-M. с соавт. [49]. В рандомизированном плацебо-контролируемом КИ (Ruijin Hospital, Китай) изучали терапевтическое действие препарата hMSC-Exos при ингаляционном введении для лечения ОРДС ($n=18$). Дизайн КИ (фаза I) был следующий: группа низких доз — ингаляции аэрозолем hMSC-Exos по 2×10^8 экзосом/сут в течение 7 сут, группа средних доз — 8×10^8 экзосом/сут, группа высоких доз — 16×10^8 экзосом/сут; фаза II: дозировка 1 — базовое лечение плюс 1/4 от МПД⁹/сут, дозировка 2 — базовое лечение плюс МПД/сут, контроль — базовое лечение плюс введение физиологического раствора¹⁰.

В ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия» (г. Самара) провели рандомизированное двойное слепое КИ по изучению безопасности и эффективности аэрозольной ингаляции при двукратном введении в течение 10 сут в дозе $(0,5-2) \times 10^{10}$ экзосом из МСК КМ при лечении пациентов с тяжелым течением пневмонии, ассоциированной с COVID-19¹¹. Ингаляционное введение экзосом призвано ускорить реабилитацию пациентов, уменьшить объем поражений легочной ткани и сократить время пребывания пациентов в стационаре.

Препараты на основе экзосом для внутривенного введения

Препарат Zofin™

Zofin™ (DrugBank ID 16519) — бесклеточный, минимально обработанный препарат, полученный из амниотической жидкости человека; содержит внеклеточные везикулы / наночастицы амниотических стволовых и эпителиальных клеток и более 300 факторов роста, цитокинов и хемокинов. Экзосомы обогащены такими молекулами, как CD63, CD81 и CD9, в дополнение к высокой экспрессии гликопротеина CD133. Цель КИ (фазы I и II) — оценить безопасность и потенциальную эффективность внутривенного введения препарата для лечения средней и тяжелой форм COVID-19 в сравнении с плацебо. Пациенты в экспериментальной группе получали препарат внутривенно по 1 мл в день 0, на 4-е и 8-е сут. Средняя концентрация везикул при их среднем размере 125,2 нм составила $5,24 \times 10^{11}$ экзосом/мл. Препарат действует

⁷ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05947747>

⁸ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04276987>

⁹ Максимально переносимая доза.

¹⁰ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04602104>

¹¹ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04491240>

<https://clinicaltrials.gov/study/NCT04602442>

как супрессор активации цитокинов для снижения тяжести COVID-19¹².

В 2021 г. компания Organicell Regenerative Medicine (США) сообщила о положительных результатах первого применения препарата в Индии: у 10 получавших препарат пациентов с COVID-19 достигнута ремиссия (исследование проходило в 4 клиниках). Далее в КИ были включены 65 пациентов со средним и тяжелым течением COVID-19 (лечение было завершено к концу июня 2021 г.). Все пациенты, получившие терапию препаратом, достигли полного выздоровления¹³. В Индийский совет медицинских исследований (Council for Medical Research, ICMR) было подано заявление для получения разрешения на экстренное применение Zofin™ в качестве лекарственного средства для лечения COVID-19.

Препарат ExoFlo™

Препарат ExoFlo™, содержащий экзосомы, полученные из МСК костного мозга, продемонстрировал высокий уровень переносимости при лечении пациентов с ОРДС, ассоциированным с COVID-19. В КИ приняли участие 102 пациента, которые получали инфузии в объеме 100 мл (15 мл препарата и 85 мл физиологического раствора) в течение 60 мин на 1-е и 4-е сут лечения. Пациенты с тяжелой или критической формой COVID-19 получали одновременно стандартное лечение. Установлено, что используемая доза ExoFlo™ была безопасна для пациентов¹⁴ [51].

Компания Direct Biologics (США) сообщила о положительных результатах, полученных в КИ с применением ExoFlo™. V. Sengupta с соавт. [52] изучали безопасность и эффективность экзосом (ExoFlo™), полученных из аллогенных МСК КМ, в нерандомизированном КИ при лечении пациентов с тяжелой формой COVID-19, а также с ОРДС тяжелой и средней степени тяжести. Пациенты получали однократную дозу ExoFlo™ (15 мл) внутривенно с последующим мониторингом их состояния в течение 2 нед. после лечения. После введения ExoFlo™ не было зафиксировано побочных эффектов в течение 72 ч. Выживаемость пациентов составила 83%. Среднее соотношение парциального давления кислорода в артериальной крови к фракции вдыхаемого кислорода ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) увеличилось на 192% ($p < 0,001$). Среднее снижение количества нейтрофилов крови составило 32%

($p < 0,001$), тогда как количество CD3^+ , CD4^+ и CD8^+ лимфоцитов увеличилось на 46% ($p < 0,05$), 45% ($p < 0,05$) и 46% ($p < 0,001$) соответственно. Средний уровень С-реактивного белка, ферритина и D-димера снизился на 77% ($p < 0,001$), 43% ($p < 0,001$) и 42% ($p < 0,05$) соответственно [52]. Таким образом, исследуемый препарат благодаря благоприятному профилю безопасности, способности восстанавливать оксигенацию, подавлять цитокиновый шторм и укреплять иммунитет представляет собой перспективное лекарственное средство для лечения тяжелой формы COVID-19.

Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA, США) присвоило препарату статус перспективного лекарственного средства в области регенеративной медицины, а также разрешило проведение КИ фазы III (2023 г.). Учитывая ограниченное количество одобренных лекарственных средств с доказанной эффективностью в снижении смертности, своевременные результаты КИ фазы III будут иметь важное значение для лечения пациентов с ОРДС и в борьбе с заболеваемостью и смертностью, вызванными SARS-CoV-2¹⁵.

Препараты Zofin™ и ExoFlo™ рекомендованы FDA к применению в КИ (табл. 2).

Препарат ARDOXSO

В США проведено КИ безопасности и эффективности препарата для внутривенного введения на основе экзосом, полученных из МСК КМ, для лечения пациентов с ОРДС тяжелой степени. Дизайн КИ был следующий: 4 группы по 5 пациентов: 1 группа – введение возрастающей дозы препарата (2×10^9 , 4×10^9 , 8×10^9 экзосом) через 1 сут в течение 5 сут; 2 группа – по той же схеме введение 8×10^9 , 4×10^9 , 8×10^9 экзосом; 3 группа – введение лечебной дозы 8×10^9 , 8×10^9 , 8×10^9 экзосом; 4 группа – введение плацебо¹⁶. Полученные данные этого пилотного КИ демонстрируют потенциальную клиническую применимость препарата.

Комбинированное лечение

Применение EV-Pure™ и WJ-Pure™

Компанией Vitti Labs получен препарат на основе МСК клеток пуповины VL-P22 (EVPure) и экзосом плацентарного происхождения VL-PX10 (WJPure). Цель КИ (фаза I) – изучение

¹² <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04384445>

¹³ <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/152560/100-percent-recovery-rate-for-covid-19-patients-treated-with-zofin/>

¹⁴ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04493242>

¹⁵ <https://bioinformant.com/direct-biologics-publication-in-chest/>

¹⁶ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04798716>

Таблица 2. Препараты на основе экзосом, использованные в клинических исследованиях^aTable 2. Application of exosome-based preparations in clinical trials^a

ClinicalTrials.gov ID	Препарат <i>Preparation</i>	Состав препарата <i>Drug composition</i>	Способ введения <i>Drug administration</i>	Страна <i>Country</i>
NCT04902183	Exo-CD24	Экзосомы аллогенных МСК <i>Exosomes of allogenic MSCs</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Греция <i>Greece</i>
NCT05947747	Exo-CD24	Экзосомы аллогенных МСК <i>Exosomes of allogenic MSCs</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Израиль <i>Israel</i>
NCT04747574	Exo-CD24	Экзосомы аллогенных МСК <i>Exosomes of allogenic MSCs</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Израиль <i>Israel</i>
NCT04969172	Exo-CD24	Экзосомы аллогенных МСК <i>Exosomes of allogenic MSCs</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Израиль <i>Israel</i>
NCT05787288	Экзосомы <i>Exosomes</i>	Экзосомы клеток пуповинной крови <i>Exosomes of umbilical blood cells</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Китай <i>China</i>
NCT04276987	Мехсcovid	Экзосомы МСК жировой ткани человека <i>Exosomes MSCs from human adipose tissue</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Китай <i>China</i>
NCT04602104	hMSC-Exos	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Китай <i>China</i>
NCT04491240	Экзосомы <i>Exosomes</i>	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Россия <i>Russia</i>
NCT04602442	Экзосомы <i>Exosomes</i>	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Россия <i>Russia</i>
NCT04384445	Zofin ^b	Экзосомы амниотической жидкости человека <i>Human amniotic fluid exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США, Индия <i>USA, India</i>
NCT05228899	Zofin ^b	Экзосомы амниотической жидкости человека <i>Human amniotic fluid exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT05643729	Zofin ^b	Экзосомы амниотической жидкости человека <i>Human amniotic fluid exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT04493242	ExoFlo ^c	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT05127122	ExoFlo ^c	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT05116761	ExoFlo ^c	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT04798716	ARDOXSO	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT05387278	EVPure <i>WJPure</i>	МСК пуповины и экзосомы из МСК плаценты / <i>MSCs from umbilical cord and exosomes from placental MSC</i>	Комб/в <i>Comb/adm</i>	США <i>USA</i>
NCT05387239	EVPure <i>WJPure</i>	МСК пуповины и экзосомы из МСК плаценты / <i>MSCs from umbilical cord and exosomes from placental MSC</i>	Комб/в <i>Comb/adm</i>	США <i>USA</i>

Таблица составлена авторами по данным литературы / The table is prepared by the authors using literature data

Примечание. МСК — мезенхимальные стромальные клетки; Инг/в — ингаляционное введение; в/в — внутривенное введение; комб/в — комбинированное введение.

^a По результатам клинических исследований все рассмотренные препараты соответствуют критериям безопасности и эффективности.

^b Регуляторные органы Пакистана разрешили использовать Zofin для лечения пациента с тяжелой формой COVID-19 (2021 г.); FDA одобрило применение Zofin для лечения пациентов с хронической обструктивной болезнью легких.

^c FDA одобрило применение ExoFlo для лечения пациентов с угрожающими жизни осложнениями от COVID-19 (2020 г.).

Note. MSC, mesenchymal stromal cells; Inh/adm, inhalation; i/v, intravenous administration; comb/adm, combined administration.

^a According to clinical trials, all the drugs considered meet the criteria for safety and efficacy.

^b Pakistani regulatory authorities have approved the use of Zofin to treat a patient with severe COVID-19 (2021); FDA has approved the use of Zofin in patients with chronic obstructive pulmonary disease.

^c FDA approved ExoFlo in patients with life-threatening COVID-19 complications (2020).

безопасности и преимуществ внутривенного введения WJPure и EVPure при лечении пациентов с COVID-19 и ОРДС средней и тяжелой степени¹⁷. Другое исследование (фаза II) было направлено на оценку преимуществ комбинации EVPure и WJPure у пациентов с COVID-19 с фиброзом легких¹⁸: экспериментальная/лечебная группа ($n=10$) – введение EVPure и WJPure на фоне стандартного лечения; группа плацебо ($n=10$) – введение криоконсервирующей среды / физиологического раствора на фоне стандартного лечения. Продолжительность исследования может составить 5 сут (лечение) с последующим периодом наблюдения в течение 12 нед.¹⁹

Совместное применение препаратов экзосом и МСК

Для повышения эффективности лечения ОРДС разрабатываются новые схемы и режимы совместного применения препаратов экзосом и МСК. М. Zarrabi с соавт. [53] представили данные рандомизированного многоцентрового КИ (фаза II) с участием 43 пациентов с COVID-19, ассоциированным с ОРДС: 11 пациентов получили внутривенно две последовательные дозы аллогенных МСК по 100×10^6 ; 8 пациентов – МСК по 100×10^6 плюс экзосомы (выделены из $200 \times 10^6 \pm 10\%$ клеток МСК и вводились ингаляционно); 24 пациента – контрольная группа. Интервал между введением препаратов составлял 48 ч. Показано, что системное введение МСК и ингаляции экзосом при использовании небулайзера были безопасными и значительно снижали уровни маркеров воспаления (IL-6, TNF- α , IFN- γ , CRP) в сыворотке крови пациентов. Смертельные исходы среди пациентов, получивших препараты экзосом и МСК, не наблюдались [53, 54].

Основные данные по КИ препаратов на основе экзосом приведены в *таблице 2*.

В 2022 г. А. Lotfy с соавт. представили данные об использовании экзосом, полученных из разных клеток (костный мозг, жировая ткань, эндометрий и др.) для лечения неврологических (эпилепсия, болезнь Паркинсона, инсульт), аутоиммунных (рассеянный склероз, ревматоидный артрит, диабет 1 типа), кардиологических и нефрологических заболеваний [55]. Приведенные ниже примеры применения препаратов на осно-

ве экзосом подтверждают, что их функциональное воздействие определяется источником МСК [56]. В экзосомах обнаружено 304 разных белковых молекул, 150 микроРНК и других биоактивных молекул [55], что в совокупности, вероятно, и определяет терапевтический эффект – восстановление различных типов тканей при патологических состояниях сердечно-сосудистой системы, заболеваниях печени, почек, легких и при неврологических расстройствах [57, 58]. Препараты экзосом изучались в следующих КИ.

Для лечения сахарного диабета I типа использовались экзосомы, полученные из МСК пуповинной крови. Экзосомы в дозах $(1,22-1,51) \times 10^6$ частиц/кг вводились дважды с интервалом в 1 нед.²⁰

В Исфаханском университете (Иран) проводилось исследование, направленное на выяснение возможностей функционального восстановления после инсульта. В экспериментах на животных было показано, что введение экзосом увеличивает количество нейробластов и эндотелиальных клеток. Экзосомы из МСК КМ вводились стереотаксически интрапаренхимально пациентам с ишемическим инсультом²¹.

В госпитале Ruijin Hospital (Китай) в нерандомизированном КИ применяли MSCs-Exos, выделенные из аллогенных МСК жировой ткани для терапии болезни Альцгеймера легкой и средней степени тяжести. Пациентам в трех группах назначали назальное введение MSCs-Exos в дозах 5 мкг, 10 мкг, 20 мкг (1 мл) 2 раза/нед. в течение 12 нед.²² [59].

В Египте инициировано исследование препарата на основе экзосом, полученных из МСК жировой ткани, аутогенно выделенной у пациентов; экзосомы предназначены для введения в пародонтальные карманы для оценки их регенеративного эффекта при лечении пародонтита²³.

Проблемные аспекты и перспективы

Препараты на основе экзосом становятся многообещающими бесклеточными терапевтическими средствами, поскольку доказана их высокая эффективность в лечении ОРДС и других заболеваний [60]. Однако не решены проблемы гетерогенности препаратов экзосом и их быстрой элиминации из организма человека [34].

¹⁷ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05387278>

¹⁸ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05387239>

¹⁹ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05387278>

²⁰ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05387239>

²¹ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02138331>

²² <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03384433>

²³ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04388982>

²⁴ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04270006>

Остается много нерешенных технических вопросов, таких как разработка универсальных легко воспроизводимых протоколов выделения экзосом и очистки их от примесей [61], определение оптимального способа хранения и уточнение эффективных лечебных доз.

Открытие А.Я. Фриденштейном стволовых стромальных клеток и разработка Р.К. Чайлахяном метода их культивирования позволили получать значимое количество этих клеток без изменений их диплоидности и дали возможность применять как сами клетки, так и их секретом в терапевтических целях. Результаты исследований Р.К. Чайлахяна с соавт. [12] указали на неоднородность первичных клеточных клонов, выращенных *in vitro* из костного мозга; позже это было подтверждено в работах S.A. Kuznetsov с соавт. [62], а также P. Bianco с соавт. [63].

Секретом культур МСК КМ содержит экзосомы, наследующие свойства материнских клеток. Следовательно, пул получаемых экзосом так же неоднороден, как и клеточная культура МСК. Авторы многих научных работ оперируют понятием «экзосомы», получаемые из МСК различных тканей, не приводя характеристик применяемых МСК. Большинство исследований с применением стволовых МСК для лечения ОРДС и осложнений после перенесенного COVID-19 имеет следующие недостатки: а) существующие методы не всегда позволяют получить

достаточное количество экзосом для проведения серийных исследований; б) отсутствуют протоколы получения однородного материала (каждая последующая партия экзосом, полученных из МСК, может иметь уже несколько иные характеристики).

Таким образом, необходимо масштабировать выращивание клеток для получения экзосом в лечебных целях и проводить стандартизацию схемы лечения, дозировок, путей и режима введения. Основной целью будущих КИ является изучение долгосрочной безопасности, иммуногенности и эффективности препаратов на основе экзосом для проведения бесклеточной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализированы данные о препаратах на основе экзосом, выделенных из культур МСК тканей костного мозга, жировой ткани, пуповины, пуповинной крови, плаценты, и оказывающих терапевтическое действие на регенерацию легочной ткани при ОРДС. В доклинических и клинических исследованиях препараты на основе экзосом вводились как в составе комбинированной терапии, так и монотерапии. Эффективны ингаляционные, внутривенные и сочетанные способы введения препаратов. Требуется стандартизация критериев получения препаратов на основе экзосом, оптимизация эффективности схем их применения и условий долгосрочного хранения.

Литература/References

1. Костин МП, Шмитко АД, Полищук ВБ, Хромова ЕА. Современные представления о новом коронавирусе и заболевании, вызванном SARS-CoV-2. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2020;9(2):33–42. Kostin MP, Shmitko AD, Polishchuk VB, Khromova EA. Modern representations of the new coronavirus and the disease caused by SARS-CoV-2. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2020;9(2):33–42 (In Russ.). <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-2-33-42>
2. Ярошецкий АИ, Грицан АИ, Авдеев СН и др. Диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома (Клинические рекомендации Общероссийской общественной организации «Федерация анестезиологов и реаниматологов»). *Анестезиология и реаниматология*. 2020;(2):5–39. Yaroshetskiy AI, Gritsan AI, Avdeev SN, et al. Diagnostics and intensive therapy of acute respiratory distress syndrome (clinical guidelines of the federation of anesthesiologists and reanimatologists of Russia). *Russian Journal of Anesthesiology and Reanimatology*. 2020;(2):5–39 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/anaesthesiology20200215>
3. Виноградов ВА, Скворцова ВИ, Каркищенко ВН и др. Способ лечения острого респираторного дистресс-синдрома доларгином и легочным сурфактантом. Патент Российской Федерации № 2728821 C1, 2020. Vinogradov VA, Skvortsova VI, Karkishchenko VN, et al. Method of treating acute respiratory distress syndrome with dolargin and a pulmonary surfactant. Patent of the Russian Federation № 2728821 C1, 2020 (In Russ.). EDN: KBSGQR
4. Wang J, Yang X, Li Y, et al. Specific cytokines in the inflammatory cytokine storm of patients with COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome and extrapulmonary multiple-organ dysfunction. *Viral J*. 2021;18:117. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01588-y>
5. Xu H, Sheng S, Luo W, et al. Acute respiratory distress syndrome heterogeneity and the septic ARDS subgroup. *Front Immunol*. 2023;14:1277161. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1277161>
6. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification and supplementary material. *Intensive Care Med*. 2012;38(10):1573–82. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2682-1>
7. Zhao L, Su F, Zhang N, et al. The impact of the new acute respiratory distress syndrome (ARDS) criteria on Berlin criteria ARDS patients: a multicenter cohort study. *BMC Med*. 2023;21:456. <https://doi.org/10.1186/s12916-023-03144-7>
8. Сизикова ТЕ, Лебединская ЕВ, Лебедев ВН, Борисевич СВ. Применение вируснейтрализующих антител для экстренной профилактики и лечения COVID-19. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2021;10(4):98–104. Sizikova TE, Lebedinskaya EV, Lebedev VN, Borisevich SV. The therapeutics, based on virus specific antibodies, for special prophylactic and current of COVID-19. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2021;10(4):98–104 (In Russ.). <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-4-98-104>
9. Арутюнов АА, Авдеев СН, Батюшкин ММ и др. Применение КОВИД-глобулина в терапии COVID-19. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2022;85(3):13–20. Arutyunov AG, Avdeev SN, Batyushin MM, et al. Using COVID-globulin in COVID-19 treatment. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2022;85(3):13–20 (In Russ.). <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2022-85-3-13-20>
10. Friedensteyn AI, Petrakova KV, Kuralesova AI, Frolova GP. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hemopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230–47. <https://doi.org/10.1097/00007890-196803000-00009>

11. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Меркулов ВА. Клинические исследования препаратов клеточной терапии: опыт рассматривания зарубежными регуляторными органами. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020;22(2):139–50. Melnikova EV, Merkulova OV, Merkulov VA. Clinical trials for cellular therapy products: conclusions reached by foreign regulatory bodies. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2020;22(2):139–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-2-139-150>
12. Friedensteyn AJ, Chailakhyan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
13. Фриденштейн АЯ, Лациник НВ, Куралесова АИ и др. Клетки-переносчики кроветворного микроокружения. В сб.: *Итоги науки и техники. Иммунология*. М: ВИНТИ; 1983. Т. 12. С. 5–28. Fridenstein AY, Latsinik NV, Kuralesova AI, et al. Cell-precursors of hemopoietic microenvironment. In: *Results of science and technology. Immunology*. Moscow: VINITI; 1983. Vol. 12. P. 5–28 (In Russ.).
14. Chailakhyan RK, Kon E, Shekhter AB, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells provide complete regeneration in a rabbit model of the Achilles tendon bundle rupture. *Int Orthop*. 2021;45(12):3263–76. <https://doi.org/10.1007/s00264-021-05168-1>
15. Гольдштейн ДВ, Макаров АВ, Фатхудинов ТХ и др. Биотрансплантат и способ лечения остеопороза. Патент Российской Федерации № 2265442 C1, 2005. Goldshstein DV, Makarov AV, Fatkhudinov TKh, et al. Biotransplant and method for treating the cases of osteoporosis. Patent of the Russian Federation № 2265442 C1, 2005 (In Russ.). EDN: HXYKOL
16. Гранов АМ, Жаринов ГМ, Зверев ОГ и др. Способ лечения аллергических заболеваний. Патент Российской Федерации № 2250773 C1, 2005. Granov AM, Zharinov GM, Zverev OG, et al. Method for treating the cases of allergic diseases. Patent of the Russian Federation № 2250773 C1, 2005 (In Russ.). EDN: HRCAYW
17. Миронов НВ, Гольдштейн ДВ, Горайнова ИИ и др. Биотрансплантат и способ лечения паркинсонизма. Патент Российской Федерации № 2259836 C1, 2005. Mironov NV, Goldshstein DV, Gorajnova II, et al. Biotransplant and method for treating the cases of parkinsonism. Patent of the Russian Federation № 2259836 C1, 2005 (In Russ.). EDN: NLVOIT
18. Гранов АМ, Жаринов ГМ, Некласова НЮ и др. Способ лечения инвазивного рака мочевого пузыря. Патент Российской Федерации № 2257219 C1, 2005. Granov AM, Zharinov GM, Neklasova NJu, et al. Method for treating noninvasive cancer of urinary bladder. Patent of the Russian Federation № 2257219 C1, 2005 (In Russ.). EDN: SARJIW
19. Шахпазян НК, Астрелина ТА, Яковлева МВ. Мезенхимальные клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012;7(1):23–33. Shahpazian NK, Astrelina TA, Yakovleva MV. Mesenchymal stem cells from various human tissues: biological properties, quality and safety assessment for clinical use. *Cell transplantation and tissue engineering*. 2012;7(1):23–33 (In Russ.). EDN: NKDSLH
20. Деев РВ. Клеточная трансплантация в программе лечения COVID-19: пересадка стволовых стромальных (мезенхимальных) клеток. *Гены и клетки*. 2020;15(2):10–19. Deev RV. Cell transplantation in the COVID-19 treatment program: stem stromal (mesenchymal) cell transplantation. *Genes & Cells*. 2020;15(2):10–19 (In Russ.). <https://doi.org/10.23868/202004012>
21. Chailakhyan RK, Averb'yanov AV, Zabozaev FG, et al. Comparison of the efficiency of transplantation of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells cultured under normoxic and hypoxic conditions and their conditioned media on the model of acute lung injury. *Bull Exp Biol Med*. 2014;157(1):138–42. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2509-x>
22. Aslam M, Baveja R, Liang OD, et al. Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(11):1122–30. <https://doi.org/10.1164/rccm.200902-0242OC>
23. Gorman E, Millar J, McAuley D, O'Kane C. Mesenchymal stromal cells for acute respiratory distress syndrome (ARDS), sepsis, and COVID-19 infection: optimizing the therapeutic potential. *Expert Rev Respir Med*. 2021;15(3):301–24. <https://doi.org/10.1080/17476348.2021.1848555>
24. Walter J, Ware LB, Matthay MA. Mesenchymal stem cells: mechanisms of potential therapeutic benefit in ARDS and sepsis. *Lancet Respir Med*. 2014;2(12):1016–26. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70217-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70217-6)
25. Matthay MA, Calfee CS, Zhuo H, et al. Treatment with allogeneic mesenchymal stromal cells for moderate to severe acute respiratory distress syndrome (START study): a randomised phase 2a safety trial. *Lancet Respir Med*. 2019;7(2):154–62. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30418-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30418-1)
26. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10):3499–506. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069716>
27. Jung JW, Kwon M, Choi JC, et al. Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. *Yonsei Med J*. 2013;54(5):1293–6. <https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.5.1293>
28. Abraham A, Krasnodembskaya A. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Stem Cells Transl Med*. 2020;9(1):28–38. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0205>
29. Bruno S, Deregibus MC, Camussi G. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunol Lett*. 2015;168(2):154–8. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.06.007>
30. Konala VB, Mamidi MK, Bhone R, et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*. 2016;18(1):13–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.008>
31. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412–20. PMID: 3597417
32. Zhang K, Cheng K. Stem cell-derived exosome versus stem cell therapy. *Nat Rev Bioeng*. 2023;1:608–9. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00064-2>
33. Ратушняк МГ, Семочкина ЮП. Экзосомы – природные наночастицы для использования в терапии. *Российские нанотехнологии*. 2020;15(4):435–50. Ratushnyak MG, Syomochkina YuP. Exosomes – natural nanoparticles for use in therapy. *Russian nanotechnology*. 2020;15(4):435–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S1992722320040123>
34. Zhuang X, Jiang Y, Yang X, et al. Advances of mesenchymal stem cells and their derived extracellular vesicles as a promising therapy for acute respiratory distress syndrome: from bench to clinic. *Front Immunol*. 2023;14:1244930. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1244930>
35. Liu C, Xiao K, Xie L. Advances in the use of exosomes for the treatment of ALI/ARDS. *Front Immunol*. 2022;13:971189. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.971189>
36. Deng H, Wu L, Liu M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate LPS-induced ARDS by modulating macrophage polarization through inhibiting glycolysis in macrophages. *Shock*. 2020;54(6):828–43. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001549>
37. Morrison TJ, Jackson MV, Cunningham EK, et al. Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(10):1275–86. <https://doi.org/10.1164/rccm.201701-0170OC>
38. Xu W, Zilong L, Lijuan H, et al. Exosomes derived from endothelial cells ameliorate acute lung injury by transferring miR-126. *Exp Cell Res*. 2018;370(1):13–23. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.06.003>
39. Monsel A, Zhu YG, Gennai S, et al. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cell-derived microvesicles in severe pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(3):324–36. <https://doi.org/10.1164/rccm.201410-1765OC>
40. Kaspi H, Semo J, Abramov N, et al. MSC-NTF (NurOwn®) exosomes: a novel therapeutic modality in the mouse LPS-induced ARDS model. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12:72. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02143-w>
41. Ткачук ВА, Акопян ЖА, Ефименко АЮ и др. Средство для лечения фиброза тканей на основе компонентов секрета мезенхимных стромальных клеток, способ получения и применения средства. Патент Российской Федерации № RU2766707 C1, 2020. Tkachuk VA, Akopian ZhA,

- Efimenko AYU, et al. Agent for treating tissue fibrosis based on components of mesenchymal stromal cell secretome, method for preparing and using the agent. Patent of the Russian Federation № RU2766707 C1, 2020 (In Russ.). EDN: CBDVKA
42. Shapira S, Schwartz R, Tsiodras S, et al. Inhaled CD24-enriched exosomes (EXO-CD24) as a novel immune modulator in respiratory disease. *Int J Mol Sci.* 2023;25(1):77. <https://doi.org/10.3390/ijms25010077>
 43. Shapira S, Shimon BM, Hay-Levi M, et al. A novel platform for attenuating immune hyperactivity using EXO-CD24 in COVID-19 and beyond. *EMBO Mol Med.* 2022;14(9):e15997. <https://doi.org/10.15252/emmm.202215997>
 44. Green O, Shenberg G, Baruch R, et al. Inhaled exosomes genetically manipulated to overexpress CD24 (EXO-CD24) as a compassionate use in severe ARDS patients. *Biomedicine.* 2023;11(9):2523. <https://doi.org/10.3390/biomedicine11092523>
 45. Liu Y, Zheng P. CD24-Siglec interactions in inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2023;14:1174789. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1174789>
 46. Fang X, Zheng P, Tang J, et al. CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol.* 2010;7:100–3. <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.119>
 47. Chen G-Y, Tang J, Zheng P, Liu Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science.* 2009;323(5922):1722–5. <https://doi.org/10.1126/science.1168988>
 48. Grigoropoulos I, Tsioulos G, Kastrissianakis A, et al. The safety and potential efficacy of exosomes overexpressing CD24 (EXO-CD24) in mild-moderate COVID-19 related ARDS. *Resp Res.* 2024;25:151. <https://doi.org/10.1186/s12931-024-02759-5>
 49. Shi M-M, Yang Q-Y, Monsel A, et al. Preclinical efficacy and clinical safety of clinical-grade nebulized allogenic adipose mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2021;10(10):e12134. <https://doi.org/10.1002/jev2.12134>
 50. Zhu Y-G, Shi M-M, Monsel A, et al. Nebulized exosomes derived from allogenic adipose tissue mesenchymal stromal cells in patients with severe COVID-19: a pilot study. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):220. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02900-5>
 51. Lightner AL, Sengupta V, Qian S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle infusion for the treatment of respiratory failure from COVID-19: A randomized, placebo-controlled clinical trial. *Chest.* 2023;164(6):1444–53. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2023.06.024>
 52. Sengupta V, Sengupta S, Lazo A, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells as treatment for severe COVID-19. *Stem Cells Dev.* 2020;29(12):747–54. <https://doi.org/10.1089/scd.2020.0080>
 53. Zarrabi M, Shahrabaf MA, Nouri M, et al. Allogenic mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles in COVID-19 induced ARDS: a randomized controlled trial. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):169. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03402-8>
 54. Hashemian SM R, Aliannejad R, Zarrabi M, et al. Mesenchymal stem cells derived from perinatal tissues for treatment of critically ill COVID-19-induced ARDS patients: a case series. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):91. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02165-4>
 55. Lotfy A, AboQuella NM, Wang H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):66. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03287-7>
 56. Börger V, Bremer M, Ferrer-Tur R, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles and their potential as novel immunomodulatory therapeutic agents. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1450. <https://doi.org/10.3390/ijms18071450>
 57. Xun C, Ge L, Tang F, et al. Insight into the proteomic profiling of exosomes secreted by human OM-MSCs reveals a new potential therapy. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110584. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110584>
 58. Hassanzadeh A, Rahmani H, Markov A, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes in regenerative medicine and cancer: overview of development, challenges, and opportunities. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):297. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02378-7>
 59. Xie X, Song Q, Dai C, et al. Clinical safety and efficacy of allogenic human adipose mesenchymal stromal cells-derived exosomes in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a phase I/II clinical trial. *Gen Psychiatr.* 2023;36(5):e101143. <https://doi.org/10.1136/gpsych-2023-101143>
 60. Lee BC, Kang I, Yu KR. Therapeutic features and updated clinical trials of mesenchymal stem cell (MSC)-derived exosomes. *J Clin Med.* 2021;10(4):711. <https://doi.org/10.3390/jcm10040711>
 61. Шевелева ОН, Домарацкая ЕИ, Паюшина ОВ. Внеклеточные везикулы и перспективы их использования для регенерации тканей. *Биологические мембраны.* 2019;36(1):3–14. Sheveleva ON, Domoratskaya EI, Payushina OV. Extracellular vesicles and prospects of their use for tissue regeneration. *Biological Membranes.* 2019;36(1):3–14 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0233475518050109>
 62. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, et al. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation *in vivo*. *J Bone Miner Res.* 1997;12(9):1335–47. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.9.1335>
 63. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 2000;105(12):1663–8. <https://doi.org/10.1172/JCI10413>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Все авторы разрабатывали концепцию рукописи, участвовали в написании текста и формулировке выводов.

Благодарности. Выражаем признательность коллегам, высказавшим критические замечания в адрес нашей статьи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. All the authors conceptualised, drafted the manuscript, and formulated the conclusions.

Acknowledgements. We would like to thank our colleagues for their critical comments on our article.

Об авторах / Authors

Куралесова Альбина Ивановна, д-р биол. наук / Albina I. Kuralesova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2935-1325>

Грошева Алла Германовна, канд. биол. наук / Alla G. Grosheva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0951-5380>

Генкина Елена Николаевна / Elena N. Genkina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7594-0473>

Есмагамбетов Ильяс Булатович, канд. биол. наук / Ilias B. Esmagambetov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Поступила 28.03.2025

После доработки 11.07.2025

Принята к публикации 12.09.2025

Received 28 March 2025

Revised 11 July 2025

Accepted 12 September 2025



Руководство по экспертизе лекарственных средств. В 3-х томах. / Под редакцией В.В. Косенко. Том 2. Экспертиза биологических лекарственных препаратов. – М.: Типография Миттель Пресс, 2025. – 360 с.

Издание посвящено как общим, так и частным вопросам экспертизы качества, эффективности и безопасности биологических лекарственных препаратов. Разработано в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации и требованиями ЕЭК в сфере регулирования обращения лекарственных средств. Проанализирован как отечественный, так и международный опыт экспертизы биологических лекарственных препаратов, включая иммунобиологические.

Предназначено для специалистов, ведущих разработку, доклинические и клинические исследования лекарственных средств, для производителей биологических лекарственных препаратов, сотрудников контрольных лабораторий и экспертов, в том числе участвующих в подготовке регистрационных досье.

Содержание

РАЗДЕЛ 1. ЭКСПЕРТИЗА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ГЛАВА I. Оценка иммуногенности лекарственных препаратов на основе рекомбинантных белков терапевтического действия

ГЛАВА II. Оценка эффективности и безопасности биоаналогичных препаратов: низкомолекулярный гепарин

ГЛАВА III. Оценка эффективности и безопасности биоаналогичных препаратов: эритропоэтин

ГЛАВА IV. Оценка эффективности и безопасности биоаналогичных препаратов: соматотропин

ГЛАВА V. Оценка эффективности и безопасности биоаналогичных препаратов: филграстим

РАЗДЕЛ 2. ЭКСПЕРТИЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

ГЛАВА VI. Оценка эффективности и безопасности плазменных и рекомбинантных препаратов фактора свертывания крови VIII

ГЛАВА VII. Оценка эффективности и безопасности плазменных и рекомбинантных препаратов фактора свертывания крови IX

РАЗДЕЛ 3. ЭКСПЕРТИЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ

ГЛАВА VIII. Оценка качества лечебно-профилактических препаратов бактериофагов по показателям «Подлинность» и «Специфическая активность»

ГЛАВА IX. Порядок отбора кандидатных производственных штаммов литически активных бактериофагов и правила ведения коллекций производственных штаммов бактериофагов

ГЛАВА X. Порядок ведения коллекций патогенных микроорганизмов

РАЗДЕЛ 4. ЧАСТНЫЕ ВОПРОСЫ ЭКСПЕРТИЗЫ КАЧЕСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ГЛАВА XI. Требования к стандартным образцам в досье на биологические лекарственные препараты

ГЛАВА XII. Рекомендации по определению вспомогательных веществ в биологических лекарственных препаратах

ГЛАВА XIII. Порядок проведения испытания биологических лекарственных препаратов на стерильность

ГЛАВА XIV. Порядок проведения испытания биологических лекарственных препаратов на присутствие микоплазм

ГЛАВА XV. Требования к питательным средам, используемым при производстве и контроле биологических лекарственных препаратов

Подробная информация о книгах представлена на сайте:

<https://www.regmed.ru/editions/publications/>

Том 1. Экспертиза отдельных групп лекарственных средств

Том 2. Экспертиза биологических лекарственных препаратов

Готовится к печати:

Том 3. Экспертиза качества и безопасность лекарственных средств



Услуги ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России



ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ



**ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ**



ВВОД В ГРАЖДАНСКИЙ ОБОРОТ



ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ МЕРОПРИЯТИЯ



ЭКСПЕРТНАЯ НАУЧНАЯ ПОМОЩЬ



МЕЖЛАБОРАТОРНЫЕ СЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ



ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ РАСЧЕТ ОБРАЗЦОВ

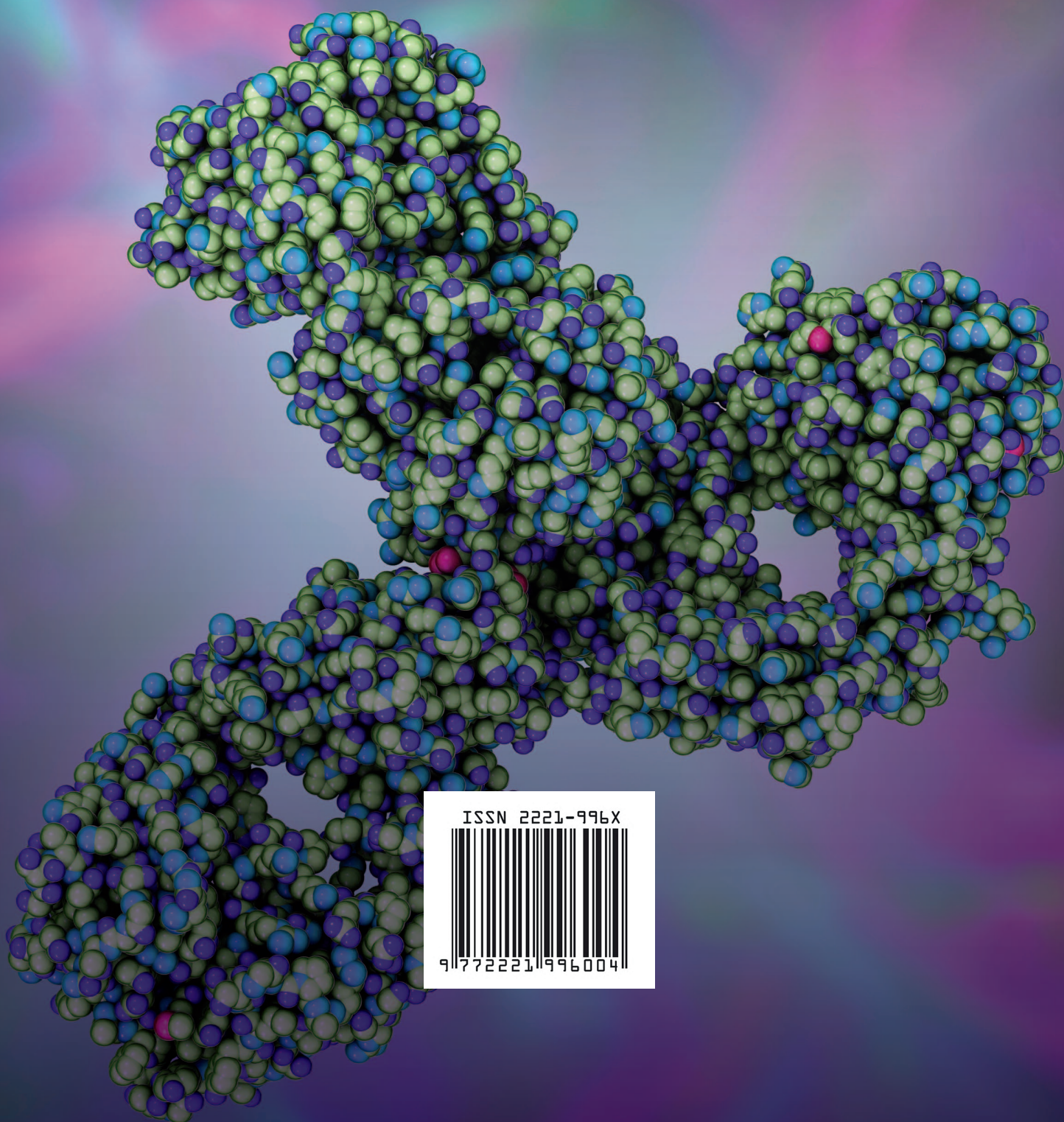


ТРАНСФЕР МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

Приглашаем к сотрудничеству всех заинтересованных
представителей фармацевтического сообщества



ISSN 2221-996X



9 772221 996004