

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

# БИО

# ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Том / Volume	№ / No.
26	1
2026	

**BIOLOGICAL PRODUCTS.**  
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

ТЕМА НОМЕРА

**Инновационные биологические  
лекарственные препараты:  
от фундаментальных исследований  
к реальной клинической практике**



25  
ЖУРНАЛУ  
ЛЕТ

[www.biopreparations.ru](http://www.biopreparations.ru)

## Страницы истории...



### [10 лет журналу «Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»](#)

*БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2011;1(41):4–5*



### [Прощай, ГИСК](#)

*БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2011;1(41):6–14*



### [Творчество Льва Александровича Тарасевича в области иммунологии и вакцинологии. К 150-летию со дня рождения](#)

*БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(2):72–74*



### [К 100-летию со дня создания в России Государственного контрольного института вакцин и сывороток](#)

*БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2019;19(1):6–9*



### [100 лет ФГБУ «Научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича». Его роль в совершенствовании системы государственного контроля качества иммунобиологических препаратов в России](#)

*Иммунология. 2019;40(4):77–83*



### [К 20-летию журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»](#)

*БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2021;21(1):6–9*



### [История создания и развития контрольно-разрешительной системы лекарственных средств в Российской Федерации \(Хронология становления ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России\)](#)



### Дорогие коллеги, читатели, друзья!

Журналу «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» исполняется 25 лет. Основанный в 2001 году, журнал прошел этот путь достойно, всегда оставаясь на передовых рубежах науки и оперативно реагируя на самые актуальные вызовы времени.

Научная повестка выпусков журнала в начале века определяла лицо биотехнологии того периода. Это было время, когда новаторскими считались исследования в области создания моноклональных антител и рекомбинантных молекул. Разрабатывались подходы к генной терапии,

создавались дендритно-клеточные вакцины. Именно в те годы закладывались теоретические основы и практические подходы к конструированию принципиально новых иммунобиологических лекарственных препаратов. Все эти и другие направления находили отражение на страницах журнала, который чутко улавливал эти тренды, формируя профессиональное сообщество вокруг самых современных на тот момент биологических технологий.

Сегодня, четверть века спустя, научный ландшафт издания изменился до неузнаваемости. Современная повестка журнала – это сложнейшие области молекулярной медицины, включая вопросы генной терапии наследственных и онкологических заболеваний, создания терапевтических микроРНК, использования клеточных технологий и разработки биомедицинских клеточных продуктов.

Этот впечатляющий путь от первых моноклональных антител до сложнейших генотерапевтических конструкций – наглядная иллюстрация того, что журнал во многом является отражением биофармацевтической науки в России.

Сегодня «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» – это авторитетное издание, включенное в Перечень ВАК, Белый список и индексируемое в российских и международных базах данных (RSCI, Scopus). Это признание высокого качества публикаций и их соответствия международным стандартам научной коммуникации.

Дорогие друзья! Четверть века для научного издания – это возраст зрелости и бесценного опыта, но в стремительном мире биотехнологий это еще и фундамент для новых свершений.

От имени ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России и от себя лично поздравляю редакцию, редакционную коллегию, авторов, рецензентов и, конечно, наших преданных читателей с этим знаменательным юбилеем. Именно ваш профессионализм и интерес делают журнал живым, авторитетным и востребованным.

Желаю журналу дальнейшего развития, расширения аудитории и укрепления позиций в ряду ведущих научно-практических изданий.

С уважением и наилучшими пожеланиями,

**В.В. Косенко,**

руководитель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

## BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

### ТОМ 26, № 1, 2026

**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 26, NO. 1, 2026

**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: Органическая химия; серия «молекулярные мечты» (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX49953939/>)

Cover image: Organic chemistry; molecular dreams series (a licensed image from the Photogenica image bank <https://photogenica.ru/zoom/PHX49953939/>)

## 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., ФГБНУ «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., ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (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., Латиноамериканский 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., «Филиал ФГБВОУ ВО Военно-медицинской академии в г. Москве» (Москва, Россия)

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

**Коровкин Алексей Сергеевич**, канд. мед. наук, ФГБНУ «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)

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

**Мовсесянц Арташес Авакович**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия)

**Мосягин Вячеслав Дмитриевич**, д-р мед. наук, проф., «Филиал ФГБВОУ ВО Военно-медицинской академии в г. Москве» (Москва, Россия)

**Свитич Оксана Анатольевна**, д-р мед. наук, академик РАН, ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия)

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

**Стома Игорь Олегович**, д-р мед. наук, проф., УО «Гомельский государственный медицинский университет» (Гомель, Республика Беларусь)

**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](mailto:Fedotovaof@expmed.ru)

**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](mailto: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**  
50 экз. Цена свободная

**Подписано в печать**  
31.03.2026

**Дата выхода в свет**  
12.04.2026

**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 мас-  
совых коммуникаций. Свидетельство  
ПИ № ФС77-82918 от 14 марта 2022 г.

© Составление, Оформление.  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,  
2026

## СОДЕРЖАНИЕ

**Тема номера:**  
**ИННОВАЦИОННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ:  
ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ К РЕАЛЬНОЙ  
КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

В.А. Меркулов  
«Свою работу строю на принципах доказательной медицины» ..... 7

А.С. Коровкин, О.Ф. Федотова, О.Ю. Гойкалова  
**К 25-летию журнала «БИОпрепараты. Профилактика,  
диагностика, лечение»** ..... 12

Л.Ф. Стовба, О.В. Чухраля, Д.И. Павельев, М.И. Солдатенкова,  
Д.П. Белозеров, А.А. Петров, С.В. Борисевич  
**Двухкомпонентная векторная вакцина  
против лихорадки Эбола Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo:  
обзор клинических исследований** ..... 15

О.А. Демидова, О.Г. Корнилова, О.В. Муслимова, В.Л. Багирова  
**Плазма крови человека в производстве лекарственных средств:  
национальные особенности в аспекте гармонизации  
с мировыми фармакопейными требованиями** ..... 28

А.А. Никонова, А.С. Порошина, Т.Г. Самарцева, А.Г. Самарцева,  
А.Д. Адельфинская, Б. Тахан, Н.Н. Шершакова, М.Р. Хаитов,  
А.С. Оксанич, Г.М. Игнатъев, В.В. Зверев  
**Т-клеточные иммунные ответы к вирусу Чикунгунья  
у неинфицированных доноров и анализ В-клеточных эпитопов  
у серопозитивных лиц и экспериментально инфицированных  
мышей (полный текст на английском языке)** ..... 42

М.А. Плотникова, В.А. Топорова, Е.А. Романовская-Романько,  
А.А. Шалджян, С.А. Клотченко  
**scFv-фрагменты рекомбинантных антител к вирусу гриппа:  
получение и характеристика функциональной активности** ..... 54

В.В. Авдеев, М.Б. Лапенкова, М.А. Владимирский  
**Долгосрочная стабильность липосомальной формы  
микобактериофага D29: комплексная оценка *in vitro*** ..... 67

Г.М. Цыганова, Е.Д. Богословская, Г.А. Шипулин,  
О.Ю. Шипулина, Е.В. Богословская  
**Влияние мутаций в местах посадки праймеров  
на эффективность выявления РНК вируса кори  
методами ПЦР и LAMP** ..... 75

Л.А. Гайдерова, М.Л. Байкова, О.В. Головинская, С.Л. Лысикова,  
В.В. Фоменко, Н.А. Алпатова  
**Оценка активности филграстима биологическим методом  
*in vitro*: валидация методики** ..... 85

С.М. Суханова, З.Е. Бердникова, О.В. Фадейкина  
**Стандартизация микробиологического метода выявления  
микоплазменной контаминации в биологических  
лекарственных препаратах: разработка стандартного  
образца *Acholeplasma laidlawii* PG8** ..... 97

С.Г. Гамалей, Г.Г. Шимица, Е.А. Вязовая, О.В. Симакова,  
Т.Г. Ядренкина, О.С. Таранов, В.В. Омигов, К.Ф. Емцова,  
Т.И. Есина, Е.А. Волосникова, Е.Д. Даниленко  
**Специфическая активность и токсичность  
лиофилизированного препарата рекомбинантного  
гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего  
фактора человека (*E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM):  
исследования *in vitro* и *in vivo*** ..... 108

**Юбилейная статистика журнала: 25-летний путь в цифрах  
и фактах** ..... 119

---

## 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 Center "Institute of Immunology" (Moscow, Russia)

### Executive Secretary

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

The journal *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* publishes reviews, original articles, and discussion articles on such issues as development of regulatory procedures, standardisation, quality control, production, and use of biological products for disease prevention, diagnosis, and treatment: immunobiological, biotechnological, 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., I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (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., Branch of the Military Medical Academy in Moscow (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., Branch of the Military Medical Academy in Moscow (Moscow, Russia)

**Oxana A. Svitich**, Dr. Sci. (Med.), Acad. RAS, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera (Moscow, Russia)

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

**Igor O. Stoma**, Dr. Sc. (Med.), Gomel State Medical University (Gomel, Republic of Belarus)

**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](mailto:Fedotovaof@expmed.ru)

### 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](mailto: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

50 copies. Free price

### Passed for printing

March 31, 2026

### Date of publication

12.04.2026

### 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, 2026

## CONTENTS

### Issue topic

#### INNOVATIVE BIOLOGICAL PRODUCTS: TRANSLATING FUNDAMENTAL RESEARCH INTO REAL CLINICAL PRACTICE

V.A. Merkulov

"My work is grounded in the principles of evidence-based medicine"....7

A.S. Korovkin, O.F. Fedotova, O.Yu. Goykalova

**To the 25th anniversary of the journal *Biological Products*.**

**Prevention, Diagnosis, Treatment** ..... 12

L.F. Stovba, O.V. Chukhralya, D.I. Paveliev, M.I. Soldatenkova,  
D.P. Belozеров, A.A. Petrov, S.V. Borisevich

**Two-component vector-based vaccine Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo**

**against Ebola fever: A review of clinical studies** ..... 15

O.A. Demidova, O.G. Kornilova, O.V. Muslimova, V.L. Bagirova

**Human plasma in the production of medicinal products: national**

**differences in terms of harmonization with global compendial**

**requirements** ..... 28

A.A. Nikonova., A.S. Poroshina, T.G. Samartseva, A.G. Samartseva,

A.D. Adelfinskaya, B. Tahhan, N.N. Shershakova, M.R. Khaitov,

A.S. Oksanich, G.M. Ignatyev, V.V. Zverev

**Chikungunya virus-specific pre-existing T cell responses**

**in naïve donors and B cell epitopes in seropositive individuals**

**and experimentally infected mice** ..... 42

M.A. Plotnikova, V.A. Toporova, E.A. Romanovskaya-Romanko,

A.A. Shaldzhyan, S.A. Klotchenko

**Production and functional activity of scFv fragments obtained**

**from recombinant antibodies against influenza virus** ..... 54

V.V. Avdeev, M.B. Lapenkova, M.A. Vladimirov

**Long-term stability of liposomal mycobacteriophage D29:**

**A comprehensive *in vitro* assessment** ..... 67

G.M. Tsyganova, E.D. Bogoslovskaya, G.A. Shipulin,

O.Yu. Shipulina, E.V. Bogoslovskaya

**Effect of primer binding sites mutations on the efficacy**

**of measles virus RNA detection using PCR and LAMP techniques** .... 75

L.A. Gaiderova, M.L. Baykova, O.V. Golovinskaya, S.L. Lysikova,

V.V. Fomenko, N.A. Alpatova

**Validation of an *in vitro* biological method for filgrastim potency**

**assessment** ..... 85

S.M. Sukhanova, Z.E. Berdnikova, O.V. Fadeikina

**Standardizing microbiological method to detect mycoplasma**

**contamination in biological products: development**

**of *Acholeplasma laidlawii* PG8 reference standard** ..... 97

S.G. Gamaley, G.G. Shimina, E.A. Vyazovaya, O.V. Simakova,

T.G. Yadrenkina, O.S. Taranov, V.V. Omigov, K.F. Emtsova, T.I. Esina,

E.A. Volosnikova, E.D. Danilenko

**Specific activity and toxicity of lyophilized recombinant human**

**granulocyte-macrophage colony-stimulating factor**

**(*E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM): *in vitro* and *in vivo* study** ..... 108

**Anniversary metrics of the journal: a 25-year history**

**in statistics and facts** ..... 119

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-7-11>

Интервью | Interview

**Вадим МЕРКУЛОВ:**

## «Свою работу строю на принципах доказательной медицины»

**Vadim MERKULOV:**

“My work is grounded in the principles of evidence-based medicine”

Доктор медицинских наук, профессор Вадим Анатольевич МЕРКУЛОВ принадлежит к той редкой категории ученых, чья профессиональная биография органично соединяет фундаментальную науку, практическую экспертизу и научную коммуникацию. Заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, профессор кафедры фармакологии Института фармации Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, член комиссии Экспертного совета РАН по модернизации и инновационному развитию медицинской науки в области нанобиотехнологий, главный редактор журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» — направления, вмещающие в себя почти три десятилетия служения отечественной медицине и фармации. Вклад В.А. Меркулова в медицинскую науку высоко оценен государством: он награжден орденом Мужества, дважды — медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» (I и II степени), медалью «Гиппократ» и орденом Пирогова. За каждой из этих и других наград стоят самоотверженность и высокий профессионализм, проявленные при исполнении врачебного долга. Сегодня под руководством Вадима Анатольевича осуществляется экспертиза самых сложных и инновационных категорий лекарственных препаратов: генотерапевтических средств, биомедицинских клеточных продуктов, высокотехнологичных вакцин и др. В интервью нашему журналу В.А. Меркулов рассказывает о том, как опыт работы в «полевых условиях» помогает в экспертной оценке, почему современная регуляторная практика невозможна без риск-ориентированного подхода и как три ипостаси: ученого, регулятора и главного редактора — обогащают друг друга в его повседневной работе.



— *Вадим Анатольевич, ваш научный путь изначально тесно связан с изучением опасных вирусных инфекций и военно-научной деятельностью, за эту работу вы были награждены орденом Мужества и медалями ордена «За заслуги перед Отечеством» (I и II степени). Как этот уникальный опыт, включая полевую диагностику, повлиял на ваше понимание биологической безопасности и подходы к экспертизе лекарств?*

Да, действительно, в определенный период своей жизни я служил и работал в вирусологическом центре микробиологии Министерства обороны Российской Федерации, где занимался такой глобальной проблемой, как обеспечение биологической безопасности страны, в частности выполнял задачи по выявлению причин вспышек неясных инфекционных заболеваний. К примеру, в 1999 году в составе мобильной диагностической группы мы в полевых условиях определили переносчика и идентифицировали возбудителя Конго-Крымской геморрагической лихорадки, что позволило оперативно принять меры по предотвращению распространения эпидемии опасной инфекции. Именно за эту работу я и мои коллеги были награждены орденом Мужества.

По роду деятельности мне также довелось участвовать в разработке современных диагностических систем и препаратов для профилактики

и лечения инфекционных заболеваний, прежде всего основанных на молекулярно-биологических принципах. Этот опыт дал мне главное: понимание того, как отдельные аспекты биологической безопасности формируются в единую систему и как ее необходимо выстраивать в дальнейшем исходя из современных угроз в этой области.

Участие в разработке диагностических систем и препаратов, профилактических средств, вакцин, иммуноглобулинов, лекарственных препаратов для лечения инфекционных заболеваний позволило мне изнутри увидеть, как это все работает, понять механизм их действия. Для того чтобы понять, как работает та или иная система, тот или иной механизм, его надо сначала разобрать на составные части, а затем снова собрать. А экспертиза — это, по сути дела, разбор доказательной базы эффективности и безопасности лекарственных препаратов, четкое понимание того, что с чем и на каких принципах взаимодействует и как та или иная система работает. Поэтому прежний опыт создания лекарственных средств и диагностических систем для меня как для эксперта имеет колоссальное значение.

— *Вы являетесь автором более 300 научных работ, патентов и разработчиком диагностических препаратов и тест-систем. Какие из ваших научных открытий или практических разработок вы считаете наиболее значимыми для медицины и почему?*

Как руководитель больших научных коллективов я достаточно продолжительное время был непосредственным соучастником процесса разработки лекарственных препаратов и соавтором научных работ, в том числе патентов, которые защищают достаточно уникальные разработки в нашей стране. Трудно сказать, какие из них самые важные, потому что все они были связаны с задачами, поставленными Министерством обороны и Министерством здравоохранения Российской Федерации по обеспечению биологической безопасности страны. В основе решения этой глобальной задачи лежит обеспечение диагностики еще неизвестных инфекционных заболеваний, выявление новых агентов, ранее не идентифицированных. Начальная картина любого инфекционного заболевания абсолютно общая, и для того, чтобы понять, какие карантинные мероприятия проводить, как лечить, как профилировать, необходимо иметь



**МЕДУНИЦЫН  
Николай Васильевич**

академик РАН, доктор  
медицинских наук,  
профессор



**БОРИСЕВИЧ  
Игорь Владимирович**

доктор медицинских  
наук, профессор



**МИРОНОВ  
Александр Николаевич**

доктор медицинских наук,  
профессор

2001

**Основание журнала.**  
Учредитель —  
ГИСК им. Л.А. Тарасевича



2010

- Создана веб-страница журнала на сайте учреждения
- Введена процедура рецензирования рукописей

2012

Учредитель —  
ФГБУ «НЦЭСМП»  
Минздрава  
России

2013

Регистрация  
в РИНЦ



достаточно эффективные, современные диагностические средства. Собственно говоря, этими задачами прежде всего и занимался большой коллектив исследователей, которые работали и служили под моим началом. По совокупности большое количество диагностических тест-систем было разработано в тот период для выявления, идентификации или лабораторной диагностики опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. Вся эта плеяда диагностических систем, а их около полутора десятков, создавалась под моим непосредственным руководством. Наверное, это и есть основное достижение и мой вклад в медицину на тот период.

**– В 2020 году вы участвовали в разработке методических требований для исследований препаратов против COVID-19, за эту работу были награждены орденом Пирогова. Как опыт борьбы с пандемией изменил подходы к оценке безопасности и эффективности вакцин и других биопрепаратов в регуляторной практике?**

Разработка методических требований для исследования препаратов против COVID-19 – это значимый результат работы не только нашего ФГБУ «Научный центр экспертизы средств

медицинского применения» Минздрава России, но и большого количества других коллективов, врачей, ученых, исследователей, которые принимали участие в обеспечении мер борьбы с пандемией COVID-19 в тот период. Этот колоссальный опыт борьбы с пандемией явился своего рода локомотивом не только для разработчиков высокоэффективных современных лекарственных препаратов, вакцин, моноклональных антител, препаратов для химиотерапии, но и способствовал совершенствованию регуляторной практики, применению порой нестандартных, гибких подходов в регулировании обращения лекарственных средств.

В итоге это позволило нам сформировать такие новые инструменты регулирования, как дистанционные экспертизы, экспертиза с выездом на площадку разработчика лекарственного препарата, а также использование высокотехнологичных методов доказательства соответствия препарата нормативным требованиям по качеству. А такие передовые инструменты, как оценка доказательства соотношения пользы и риска лекарственных препаратов, вакцин, синтетических препаратов для цели химиотерапии, сывороток, моноклональных антител и ряда других,



**ОЛЕФИР**  
Юрий Витальевич  
доктор медицинских наук



**МЕРКУЛОВ**  
Вадим Анатольевич  
доктор медицинских наук,  
профессор

2015

2018

- Создан официальный двуязычный сайт журнала
- Присваиваются DOI статьям
- Включение в базу DOAJ

2020

- Chemical Abstracts Service (CAS)
- Embase (Elsevier)

2021

- Russian Science Citation Index (RSCI)
- ВАК



2023

- ВАК (по научным специальностям)
- Белый список

2025

SCOPUS

которые использовались в тот период для лечения COVID-19, в настоящее время применяются для терапии уже других острых респираторных вирусных инфекционных заболеваний.

**– Ваши научные интересы, такие как разработка противовирусных средств, молекулярная диагностика и регенеративная медицина, носят прикладной характер. Как вам удается находить баланс между фундаментальными исследованиями и практическими задачами, которые стоят перед ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России как ключевым экспертно-регуляторным центром?**

Такой баланс, безусловно, очень важен. Основная практическая задача, которой занимается наш коллектив по заданию Минздрава России, это проведение экспертизы лекарственных препаратов с доказательством их эффективности и безопасности для последующей их регистрации. То, что наш научный центр занимается не только экспертизой, но и фундаментальной наукой в области регулирования лекарственных препаратов, позволяет нам вырабатывать четкие, легитимные механизмы оценки качества, эффективности и безопасности лекарственных средств. Я уже вначале говорил: чтобы систему «разобрать», нужно понимать, как она собрана. Именно понимание, с точки зрения фундаментальной науки, как разрабатывается препарат, как он производится, как обращается на рынке и т.д., дает возможность нашему коллективу комплексно смотреть на проблему экспертизы, учитывая все возможные аспекты регулирования лекарственных препаратов.

**– На посту заместителя генерального директора по экспертизе лекарственных средств вы отвечаете за ключевой процесс – экспертизу препаратов в целях их государственной регистрации. Какие основные вызовы и тренды вы видите сегодня в экспертизе, особенно в отношении высокотехнологичных лекарственных препаратов, таких как генотерапевтические и клеточные продукты?**

Основные вызовы диктуют нам потребности современной системы здравоохранения. У нас, как и во всем мире, главные вызовы и тренды формируются в отношении спектра высокотехнологичных лекарственных препаратов, генотерапевтических и клеточных продуктов для лечения тех же инфекционных заболеваний, которые, к сожалению, никуда не исчезли, онкологических, наследственных и орфанных патологий. Эти инновационные препараты направлены для решения одной задачи: эффективно лечить болезни, которые являются

вызовами как для человечества в целом, так и для российского национального здравоохранения в частности.

**– А каковы, на ваш взгляд, основные принципы, на которых строится современная регуляторная оценка таких инновационных препаратов?**

Главный принцип в общем-то достаточно стандартный – это риск-ориентированный подход. Этот принцип выработался сравнительно недавно и характерен практически для всех стран. Дело в том, что современные инновационные препараты, как правило, являются персонализированными и не подлежат серийному производству. Их использование, эффективность и безопасность основываются не на высокой доказательной статистической базе в рамках клинических исследований, а на индивидуальных особенностях конкретного пациента. Поэтому приходится применять различные ортогональные методы оценки качества препаратов, скрупулезно изучать их в рамках доклинических исследований. Все это позволяет нам выводить на рынок препараты для лечения онкологических, наследственных, орфанных и других серьезных заболеваний с высокой степенью эффективности.

**– Вы являетесь профессором Сеченовского Университета и руководили подготовкой множества диссертационных работ. Насколько важно, на ваш взгляд, совмещение практической регуляторной деятельности с подготовкой научных кадров для будущего отечественной фармации и биотехнологий?**

Специалисты, которые работают в области регулирования и экспертизы, как правило, приходят в экспертные учреждения, уже имея за плечами достаточно богатый опыт научно-исследовательской работы, что зачастую связано также с подготовкой кадров. Я уже много лет занимаюсь научно-педагогической деятельностью: с 2008 года работал в Российском национальном исследовательском медицинском университете им. Н.И. Пирогова в должности профессора кафедры медицинских нанобиотехнологий, а с 2017 года и по настоящее время преподаю в Первом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова в должности профессора кафедры фармакологии Института фармации. Таким образом, я имею честь участвовать в учебно-подготовительном процессе специалистов, которые ориентированы на всю фармацевтическую отрасль, включая регулирование лекарственных средств, и, конечно же, участвовать в подготовке

будущих молодых сотрудников для нашего уникального, единственного в стране экспертного учреждения.

**– Вадим Анатольевич, на протяжении ряда лет вы возглавляете научно-практический журнал «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», заявленный как единственное в России издание, посвященное полному циклу разработки биологических лекарственных препаратов. Какова, по-вашему, его особая миссия в условиях текущего развития биотехнологической отрасли?**

Главная миссия журнала – это агрегирование или аккумулирование самых последних достижений в области разработки, создания, производства, экспертизы, доказательства эффективности и безопасности биологических, биотехнологических, генотерапевтических, клеточных препаратов. Это комплексный журнал с точки зрения данной проблематики, другого такого нет.

**– В качестве главного редактора вы отвечаете за формирование контента, который охватывает все темы – от доклинических исследований лекарственных средств до их клинического применения. На какие ключевые направления, например вакцинологию, клеточную терапию или моноклональные антитела, вы делаете стратегическую ставку и почему?**

Я бы никаким образом не разделял эти направления. Уже в самом названии журнала заложен комплексный подход: профилактика, диагностика, лечение. Фокус на профилактику обеспечивают вакцинные препараты, диагностические системы позволяют выявить заболевание, а использование клеточной терапии и моноклональных антител реализует современные подходы к лечению ранее не излечимых заболеваний, в том числе имеющих генетическую предрасположенность. Мы с большим интересом изучаем рукописи, поступающие к нам в редакцию по всем этим направлениям – вакцинологии, биотехнологии, генотерапии и другим. Они все важны.

**– Как вам удается обеспечивать баланс между научной строгостью, актуальностью публикаций и необходимостью быстро реагировать на запросы практикующих врачей и ученых?**

Считаю, что мне как главному редактору в этом смысле очень повезло: над созданием журнала работает высокопрофессиональный коллектив. Научные редакторы помогают авторам довести их рукопись до соответствия самым

высоким публикационным стандартам; двойное слепое рецензирование, следование рекомендациям и правилам COPE, WAME и ICMJE обеспечивает научную строгость, а редакционная коллегия выстраивает стратегию и тактику журнала, что позволяет очень гибко реагировать на запросы профессионального сообщества – практических врачей, ученых, разработчиков и производителей лекарственных препаратов.

За 25 лет своего существования журнал накопил значительный потенциал для того, чтобы занять достойное место в плеяде передовых международных журналов по биомедицине.

**– Вадим Анатольевич, ваша деятельность уникальным образом соединяет фундаментальную науку, прикладную экспертизу и научную коммуникацию. Как эти три ипостаси – ученый, регуляторный эксперт и главный редактор – взаимно обогащают друг друга в вашей работе?**

Все эти три ипостаси очень органично связаны между собой. Не занимаясь практической наукой, наверное, я бы не смог стать экспертом, знающим, как мне кажется, многие аспекты экспертизы различного класса лекарственных препаратов. А будучи главным редактором, я имею возможность знакомиться с передовыми достижениями в области разработки, производства и регулирования лекарственных средств. Получается такая триединая концептуальная модель: научная деятельность – экспертиза – транслирование научных знаний. Еще раз напомним, что каждое из этих направлений реализуется мной не в одиночку, а в рамках больших профессиональных коллективов. Главное, чтобы все это развивалось эффективно и гармонично для обеспечения одной цели – разработки и выпуска в гражданский оборот высокоэффективных и безопасных лекарственных препаратов для решения всех вызовов нашего здравоохранения.

**– Могли бы вы сформулировать единый принцип, который лежит в основе вашей работы и как ученого, и как регулятора, и как главного редактора?**

Принцип достаточно простой и лаконичный: это принцип доказательности. В настоящее время именно доказательная медицина является основной и естественной формой клинической практики в области биомедицины, и не только.

**Беседовала Ольга Федотова**

## К 25-летию журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»

Ровно 25 лет назад, в первом квартале 2001 г., увидел свет первый выпуск журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». В то время журнал назывался проще – «Биопрепараты». Официальными учредителями журнала числились ООО «МЕДЭП – центр иммунопрофилактики» и «Гелла-Принт», но вся работа по формированию журнала, его продвижению в профессиональном сообществе, привлечению новых авторов и редактированию рукописей была теснейшим образом связана с Государственным институтом стандартизации и контроля медицинских иммунобиологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, в отношении которого чаще использовалось сокращенное устоявшееся название «ГИСК», или «ГИСК им. Л.А. Тарасевича», или еще проще – «ГИСК Тарасевича».

ГИСК им. Л.А. Тарасевича выполнял функции Национального органа контроля качества медицинских иммунобиологических препаратов. Основная деятельность института заключалась в проведении работ в рамках экспертизы и стандартизации иммунобиологических лекарственных препаратов, как выпускаемых отечественными предприятиями всех форм собственности, так и импортируемых из-за рубежа.

Идея создания научного журнала принадлежала директору ГИСК им. Л.А. Тарасевича выдающемуся российскому иммунологу, доктору медицинских наук, академику РАН Николаю Васильевичу Медуницыну, который руководил институтом на протяжении 20 лет – с 1989 до конца 2009 года, – в крайне непростое для нашей страны время. Имя Н.В. Медуницына хорошо знакомо не только профильным специалистам, но и всем выпускникам медицинских вузов нашей страны как одного из авторов учебника по основам микробиологии, иммунологии и вакцинологии. В 1990-е годы, несмотря на сложнейшие вызовы времени и, казалось бы, неразрешимые проблемы, ГИСК под его руководством стабильно работал, обеспечивая надзор за качеством иммунобиологических лекарственных препаратов, в том числе вакцин.

Цель издания профильного научного журнала, посвященного биологическим препаратам, состояла именно в том, чтобы и сотрудники института, и представители иммунобиологической индустрии имели возможность публиковать результаты своих научных исследований в области разработки и производства биопрепаратов.

Главным редактором журнала «Биопрепараты» в первые 8 лет его существования – с 2001 по 2010 г. – был Николай Васильевич Медуницын. Заместителем главного редактора стал доктор медицинских наук, профессор Тагир Абдуллаевич Бектемиров, который, будучи заместителем директора ГИСК им. Л.А. Тарасевича, на этапе становления журнала сыграл огромную роль в формировании его научной тематики и редактировании рукописей, используя для этого весь свой обширный опыт и знания.

Руководство журналом в 2010 г. перешло к доктору медицинских наук, профессору Игорю Владимировичу Борисевичу. Всего лишь за год с небольшим ему удалось немало сделать для развития издания: сформировать профессиональную редакцию, получить ISSN, включить журнал в РИНЦ, создать веб-страницу журнала на сайте учреждения. Была введена обязательная процедура рецензирования рукописей, разработаны единые требования к оформлению статей, а объем журнала увеличился в полтора раза. Именно в этом году на издательских страницах журнала появляется фото Л.А. Тарасевича – дань огромного уважения к талантливому учителю.

В декабре 2010 года ГИСК им. Л.А. Тарасевича в результате ряда реорганизаций был присоединен к ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. Целью такого слияния стало создание единой мощной отечественной структуры, предназначенной для осуществления экспертизы качества, эффективности и безопасности всех лекарственных средств, включая иммунобиологические препараты.

Исторически так сложилось, что функция главного редактора журнала «БИОпрепараты...» передавалась от одного руководителя ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России к другому.

Пришедший в 2012 г. к руководству журналом доктор медицинских наук, профессор Александр Николаевич Миронов предпринял очень важный на тот момент шаг: провел все необходимые регистрационные процедуры, сделав учредителем журнала ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. И хотя в 2012 г. был издан всего лишь один выпуск, дальнейшее развитие журнала уже шло планомерно и последовательно.

С 2015 по 2021 г. журнал возглавлял доктор медицинских наук Юрий Витальевич Олефир,

а с июня 2021 г. по настоящее время главным редактором журнала выступает доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России Вадим Анатольевич Меркулов.

С первых лет своего существования «БИО-препараты...» отличались активностью редакционной коллегии. В разные годы в состав редколлегии журнала входили известные советские и российские ученые: выдающиеся микробиологи и иммунологи академики РАН Анатолий

Андреевич Воробьев и Борис Федорович Семенов; вакцинологи профессора Николай Аркадьевич Озерецковский и Владимир Кириллович Таточенко; уже упомянутый профессор Тагир Абдуллаевич Бектемиров и основатель российской школы эпидемиологии академик РАН Валентин Иванович Покровский.

На протяжении многих лет и по сегодняшний день активное участие в работе журнала принимают стоявшие у его истоков профессора А.А. Мовсесянц, В.П. Бондарев, Р.А. Хамитов, Г.М. Игнатъев, Ж.И. Авдеева, С.В. Борисевич и др.



### Лев Александрович Тарасевич

**2 [14] февраля 1868, Тирасполь, Херсонская губерния – 12 июня 1927, Дрезден**

Русский и советский иммунолог, эпидемиолог, микробиолог, патолог, организатор здравоохранения и медицинской науки. Доктор медицины, профессор, Герой Труда. Создание журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» неразрывно связано с работой Государственного института стандартизации и контроля медицинских иммунобиологических препаратов им. Л.А. Тарасевича.

В память об этой исторической связи портрет Льва Александровича Тарасевича традиционно долгие годы размещался на издательских страницах журнала.

Отметим основные жизненные вехи нашего замечательного соотечественника.

Л.А. Тарасевич в 1893 г. начал обучение на медицинском факультете Парижского университета, который окончил в 1897 г. и, в том же году защитил диссертацию на соискание степени доктора медицины. В 1900–1902 гг. работал в Институте Пастера в Париже в лаборатории другого выдающегося выходца из Российской империи – Ильи Ильича Мечникова, под чьим началом изучал различные аспекты теории клеточного иммунитета.

Вернувшись в Россию, Лев Александрович продолжал преподавательскую работу – сначала в Одессе, затем в Москве. Однако важнейшей жизненной вехой Л.А. Тарасевича является его работа в качестве эпидемиолога Юго-Западного фронта российской армии в Первой мировой войне. Лев Александрович добился массовых прививок военнослужащих против брюшного тифа и холеры, но был убежден, что это лишь частичная мера и что для победы над болезнями необходимо вакцинировать все население страны. «Прививки не являются, конечно, ни абсолютным, ни идеальным средством, но они представляют по обстоятельствам настоящего времени наиболее существенную предупредительную меру по отношению к целому ряду заболеваний, и проведение их надо признать обязательным», – писал ученый в своих работах.

Именно Л.А. Тарасевич вместе с Николаем Александровичем Семашко стал родоначальником программы массовой вакцинации населения (в первую очередь – новорожденных против туберкулеза с применением БЦЖ-вакцины), с годами приобретшей форму Национального календаря профилактических прививок. Впоследствии Лев Александрович стал автором программы противоэпидемических мероприятий для Медицинского совета при Временном правительстве, а затем – в молодой Советской России. Именно работы Л.А. Тарасевича заложили основы российской и советской эпидемиологических школ, традиционно посвященных изучению и предотвращению распространения инфекционных болезней.

Не менее значимы заслуги Л.А. Тарасевича как основателя системы государственного надзора за качеством вакцин и сывороток. В октябре 1918 г. на Первом съезде бактериологов и эпидемиологов России было принято решение о необходимости организации в стране специального Контрольного института. В январе 1919 г. по приказу народного комиссара здравоохранения Н.А. Семашко был организован сыгравший большую роль в широком внедрении специфической профилактики инфекционных заболеваний Государственный контрольный институт сывороток и вакцин (до 2010 г. – Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов), где Тарасевич был директором.

В 2027-м исполнится 100 лет, как не стало Льва Александровича Тарасевича, 16 лет назад перестал существовать ГИСК его имени, но живы люди, бережно хранящие память об этом человеке и так же, как он, преданные науке и раз и навсегда выбранному пути. И продолжает жить и развиваться научный журнал «БИОпрепараты...» – как связующее звено между прошлым и будущим...

География участников редакционной коллегии неизменно расширяется, и к настоящему времени в состав редколлегии журнала входят не только российские ученые, но и представители других государств: Беларуси, Казахстана, Словакии, США, Австрии, Никарагуа.

За четверть века своего существования журнал «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» прошел большой путь развития, и сделал это достойно, всегда оставаясь на передовых рубежах науки и оперативно реагируя на самые актуальные вызовы времени. По содержанию журнала можно изучать историю формирования биотехнологии как науки: от первых моноклональных антител до сложнейших генотерапевтических конструкций. В настоящее время журнал «БИОпрепараты...» является единственным изданием в России, отражающим полный жизненный цикл биологических лекарственных препаратов – от их разработки до производства и медицинского применения. На его страницах публикуются статьи, посвященные актуальным вопросам разработки регуляторных процедур, стандартизации, контроля качества, производства терапевтических, профилактических и диагностических биологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов.

Последние несколько лет журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» были наполнены новыми позитивными изменениями. Радикально улучшен его дизайн, более

чем в два раза увеличен объем, усовершенствован интернет-сайт журнала, отработаны алгоритмы работы с рукописями, взаимодействия с авторами и рецензентами, введена практика тематического планирования выпусков журнала и его продвижения в научном информационном пространстве, значительно повысились требования к уровню оформления статей, но самое главное – повысилось качество публикуемых работ.

Знаком признания высокого качества публикаций и их соответствия международным стандартам научной коммуникации является то, что журнал «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» сегодня представляет собой по-настоящему авторитетное издание, включенное в Перечень ВАК, Белый список и индексируемое в российских и международных базах данных (RSCI, Scopus). А лицензия открытого доступа делает контент журнала открытым всему миру.

Понятно, что за всеми этими достижениями стоит большая работа учредителя и главного редактора, коллектива редакции и рецензентов, редакционной коллегии и издательства.

Пожелаем нашему любимому журналу «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» успехов в его дальнейшем пути!

**А.С. Коровкин  
О.Ф. Федотова  
О.Ю. Гойкалова**








УДК 615.371:615.076:615.038

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-15-27>

Обзор | Review



## Двухкомпонентная векторная вакцина против лихорадки Эбола Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo: обзор клинических исследований

Л.Ф. Стовба , О.В. Чухрала , Д.И. Павельев , М.И. Солдатенкова ,  
Д.П. Белозеров , А.А. Петров , С.В. Борисевич 

Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, ул. Октябрьская, д. 11, г. Сергиев Посад-6, Московская область, 141306, Российская Федерация

✉ Борисевич Сергей Владимирович; [48cnii@mil.ru](mailto:48cnii@mil.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Существующие вакцины против лихорадки Эбола обладают высокой реактогенностью, что обуславливает необходимость разработки более безопасных и эффективных препаратов. Решением проблемы является применение новых рекомбинантных векторных вакцин, таких как Ad26.ZEBOV (вакцина на основе нереплицирующегося аденовируса человека серотипа 26 со встроенным геном гликопротеина штамма Zaire ebolavirus), MVA-BN-Filo (вакцина на основе модифицированного вируса осповакцины штамма Ankara), изучаемых в клинических исследованиях для подтверждения их эффективности и безопасности.

**ЦЕЛЬ.** Систематизация данных клинических исследований по оценке эффективности, безопасности и иммуногенности двухкомпонентной рекомбинантной векторной вакцины Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo для профилактики лихорадки Эбола у различных групп населения.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Анализ литературных источников проводили в базах данных PubMed, ScienceDirect и eLIBRARY.RU за период 2009–2024 гг. Результаты клинических исследований I–III фаз подтвердили, что двухкомпонентная схема вакцинации против лихорадки Эбола (Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo) обеспечивает выраженный и стойкий иммунный ответ. Сероконверсия достигала 87–95% через 3 нед. после введения первой дозы и до 100% после ревакцинации, при этом иммунитет сохранялся не менее года. Нежелательные явления (местные и системные в легкой или средней степени выраженности) наблюдались примерно у половины участников; серьезные нежелательные явления не были связаны с вакцинацией и встречались менее чем у 1% вакцинированных. У беременных женщин вакцинация не увеличивала риск неблагоприятных исходов и обеспечивала передачу антител плоду. У детей и подростков сероконверсия превышала 90%, а ревакцинация значительно усиливала иммунный ответ. У ВИЧ-инфицированных сероконверсия достигала 80–85%, что сопоставимо с общей популяцией. Малярия и гельминтозы не снижали эффективность иммунизации. На основании полученных данных Всемирная организация здравоохранения и Европейское агентство по лекарственным средствам в 2020 г. одобрили данную схему вакцинации для применения у взрослых и детей старше одного года, включая пациентов с сопутствующими инфекциями.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Двухкомпонентная вакцина Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo характеризуется высокой иммуногенностью и благоприятным профилем безопасности. Схема первичной вакцинации и ревакцинации эффективна для взрослых, детей старше одного года, беременных женщин и лиц с сопутствующими инфекциями, включая ВИЧ, малярию и гельминтозы. Применение вакцины позволяет снизить риск распространения лихорадки Эбола и может служить основой для стратегии массовой иммунизации в эндемичных регионах и при вспышках заболевания.

**Ключевые слова:** лихорадка Эбола; вирус Эбола; вакцина; векторная вакцина; двухкомпонентная вакцина; вакцинация; ревакцинация; клинические исследования; иммуногенность; безопасность

© Л.Ф. Стовба, О.В. Чухрала, Д.И. Павельев, М.И. Солдатенкова, Д.П. Белозеров, А.А. Петров, С.В. Борисевич, 2026  
Издатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

**Для цитирования:** Стовба Л.Ф., Чухралья О.В., Павельев Д.И., Солдатенкова М.И., Белозеров Д.П., Петров А.А., Борисевич С.В. Двухкомпонентная векторная вакцина против лихорадки Эбола Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo: обзор клинических исследований. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(1):15–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-15-27>

**Финансирование.** Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

**Потенциальный конфликт интересов.** С.В. Борисевич является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2021 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Two-component vector-based vaccine Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo against Ebola fever: A review of clinical studies

Lyudmila F. Stovba , Oleg V. Chukhralya , Dmitry I. Paveliev ,  
Maria I. Soldatenkova , Denis P. Belozеров , Alexander A. Petrov ,  
Sergey V. Borisevich ✉

48th Central Scientific Research Institute, 11 Oktyabrskaya St., Sergiev Posad-6, Moscow Region  
141306, Russian Federation

✉ Sergey V. Borisevich; [48cnii@mil.ru](mailto:48cnii@mil.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** High reactogenicity of the existing Ebola vaccines necessitates the development of safer and more efficacious alternatives. A solution is to use new recombinant vector-based vaccines, such as Ad26.ZEBOV (a recombinant vaccine based on non-replicating human Ad26 serotype with an inserted glycoprotein gene of Zaire ebolavirus strain) and MVA-BN-Filo (a recombinant vaccine based on modified vaccinia Ankara strain), currently undergoing clinical trials to confirm their efficacy and safety.

**AIM.** This study aimed to systematize clinical trial data in order to assess efficacy, safety, and immunogenicity of the two-component recombinant Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo vaccine used to prevent Ebola hemorrhagic fever in various population groups.

**DISCUSSION.** Literary sources were analyzed in the PubMed, ScienceDirect, and eLIBRARY.RU databases over the period of 2009–2024. Phase I–III clinical trials confirmed that the two-component Ebola vaccination regimen (Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo) provides a strong and sustained immune response. Seroconversion reached 87–95% three weeks after the first administration and up to 100% after revaccination, with immunity lasting for at least a year. Adverse events (local and systemic, mild to moderate severity) were observed in half of the participants; serious adverse events were not associated with vaccination and occurred in less than 1%. In pregnant women, the vaccination did not increase the risk of adverse outcomes while ensuring the transmission of antibodies to the fetuses. In children and adolescents, seroconversion exceeded 90%; revaccination significantly enhanced the immune response. In HIV-infected individuals, seroconversion reached 80–85%, which is comparable to the general population. Malaria or helminthiasis did not reduce the immunization effectiveness. Considering the above, the World Health Organization and the European Medicines Agency approved this vaccination schedule in 2020 in adults and children over one year of age, including those with concomitant infections.

**CONCLUSIONS.** The two-component Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo vaccine shows high immunogenicity and a good safety profile. The primary and booster vaccination schedule is effective in adults, children over one year of age, pregnant women, and individuals with concurrent infections, including HIV, malaria, and helminthiasis. The vaccine reduces the risk of Ebola transmission and can be used for a mass immunization strategy in endemic regions and during the disease outbreaks.

**Keywords:** Ebola virus disease; Ebolavirus; vaccines; virus-based vaccines; heterologous prime-boost vaccination; vaccination; revaccination; clinical trials; immunogenicity, vaccine; safety

**For citation:** Stovba L.F., Chukhralya O.V., Paveliev D.I., Soldatenkova M.I., Belozherov D.P., Petrov A.A., Borisevich S.V. Two-component vector-based vaccine Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo against Ebola fever: A review of clinical studies. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(1):15–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-15-27>

**Funding.** The study was performed without external funding.

**Disclosure.** S.V. Borisevich has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. The other authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Лихорадка Эбола (болезнь, вызванная вирусом Эбола, БВВЭ) – тяжелое зооантропонозное заболевание, впервые зарегистрированное в 1976 г. в Демократической Республике Конго (ДРК)<sup>1</sup> [1]. Спорадические вспышки с летальностью до 70% возникали в Габоне, Республике Конго и ДРК [1]. Крупнейшая вспышка БВВЭ в Западной Африке (2013–2016 гг.) стимулировала ускоренную разработку средств профилактики и лечения [1]. Заболевание отнесено Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) к группе особо опасных вирусных инфекций, характеризующихся высокой летальностью и значительным эпидемическим потенциалом, что подчеркивает необходимость разработки эффективных вакцин<sup>2</sup>.

До 2014 г. не существовало одобренных ВОЗ вакцин для профилактики БВВЭ. В 2019 г. первой одобренной вакциной стала rVSV-ZEBOV-GP – рекомбинантная живая векторная вакцина на основе вируса везикулярного стоматита (VSV) с встроенным геном гликопротеина (GP) штамма Zaire ebolavirus (ZEBOV) (Merck, США). Препарат был рекомендован ВОЗ для применения при вспышках в ДРК. Вакцина показала высокую эффективность, но обладала выраженной реактогенностью [2, 3]. В связи с этим Стратегическая консультативная группа экспертов ВОЗ по иммунизации (Strategic advisory group of experts on immunization, SAGE) рекомендовала разработку новых безопасных вакцин, способных индуцировать полноценный иммунный ответ [4]. В результате была разработана двухкомпонентная схема иммунизации на основе рекомбинантных векторных ДНК-вакцин Ad26.ZEBOV и MVA-BN-Filo. Ad26.ZEBOV – рекомбинантная векторная вакцина на основе нереплицирующегося аденовируса человека серотипа 26 (Ad26) со встроенным геном GP вируса ZEBOV; MVA-BN-Filo – рекомбинантная векторная вакцина на основе модифицированного вируса осповакцины штамма

Ankara (MVA) (Janssen Vaccines & Prevention B.V., Нидерланды) [5–8]. Клинические исследования (КИ) проводились после одобрения данных вакцин ВОЗ и Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) в 2020 г. [8].

Цель работы – систематизация данных клинических исследований по оценке эффективности, безопасности и иммуногенности двухкомпонентной рекомбинантной векторной вакцины Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo для профилактики лихорадки Эбола у различных групп населения.

Поиск литературных источников проводился в базах данных PubMed, ScienceDirect и eLIBRARY.RU за период 2009–2024 гг. Были отобраны публикации, посвященные оценке эффективности, безопасности и иммуногенности двухкомпонентной вакцины против лихорадки Эбола Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo. Использовались ключевые слова на английском и русском языках: «Ad26.ZEBOV», «MVA-BN-Filo», «Ebola virus vaccine», «clinical trial», «immunogenicity», «safety», «вакцина против лихорадки Эбола», «клиническое исследование», «иммуногенность», «безопасность». В PubMed было выявлено 102 публикации (релевантных – 47), в ScienceDirect – 86 (релевантных – 39), в eLIBRARY.RU – 11. Дополнительно использованы официальные материалы ВОЗ и EMA<sup>3</sup>.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### Обоснование разработки вакцин против лихорадки Эбола

Лихорадка Эбола – заболевание, вызываемое вирусами рода *Ebolavirus* семейства *Filoviridae*. Высокий уровень летальности при заболевании и значительная скорость трансмиссии возбудителя обусловили необходимость разработки эффективной вакцины.

Попытки создания классических вакцин на основе инактивированного вируса оказались неудачными из-за отсутствия защитного иммунитета

<sup>1</sup> Preliminary results on the efficacy of rVSV-ZEBOV-GP Ebola vaccine using the ring vaccination strategy in the control of an Ebola outbreak in the Democratic Republic of the Congo: an example of integration of research into epidemic response. WHO; 2019.

<sup>2</sup> Ebola virus disease vaccine target product profile. WHO; 2016.

<sup>3</sup> Zabdeno. EPAR – product information. EMA; 2020.

на моделях заболевания с использованием животных [9]. Основной причиной низкой эффективности является молекулярная организация гена GP вируса Эбола, который кодирует три белка – GP1,2, sGP и ssGP. Секреторный белок sGP имеет участки аминокислотной последовательности, общие со структурным гликопротеином GP1,2, и способен связывать вирус-специфические антитела, подавляя нейтрализующий иммунный ответ [10]. Кроме того, sGP может выступать как фактор вирулентности, способствуя адаптации вируса при серийных пассажах и инфекции животных [11].

Разработка рекомбинантных гетерологичных вирусных векторов, кодирующих целевые гены или их фрагменты, позволила преодолеть указанные ограничения и создать вакцины, способные индуцировать полноценный гуморальный и клеточный иммунный ответ. Векторные вакцины обеспечивают высокую и длительную экспрессию целевого трансгена [1], демонстрируя в исследованиях на животных до 100% защиты, что позволило им стать перспективными кандидатами для КИ [2].

Первой живой рекомбинантной вакциной для однократного применения стала вакцина rVSV-ZEBOV-GP, содержащая ген GP штамма Zaire ebolavirus, которая показала эффективность 97,5–100% при кольцевой вакцинации в Гвинею во время вспышки 2014–2016 гг. и была рекомендована ВОЗ при вспышках в ДРК. Вакцина использовалась для иммунизации взрослого населения в США и ряде африканских стран [3]. Несмотря на высокую иммуногенность, применение вакцины сопровождалось выраженной реактогенностью: наблюдались кожные реакции в виде сыпи и везикул, а также более чем в 20% случаев – артралгии и артриты [4]. В связи с этим эксперты ВОЗ (SAGE) рекомендовали разработку вакцин с более благоприятным профилем безопасности и высокой иммуногенностью [5].

### Двухкомпонентная вакцина

Для профилактики лихорадки Эбола была предложена гетерологичная схема иммунизации, включающая две рекомбинантные векторные вакцины. Первый компонент, Ad26.ZEBOV, представляет собой нереплицирующуюся векторную вакцину на основе аденовируса (Ad26), кодирующую GP вируса Эбола штамма Mayinga. Второй компонент, MVA-BN-Filo, нереплицирующийся вектор на основе вируса MVA, кодирующего GP вирусов Эбола видов Заир (штамм Mayinga) и Судан (штамм Gulu), GP вируса

Марбург (штамм Musoke), а также нуклеопротеин вируса Эбола вида Tai Forest ebolavirus. Вакцина Ad26.ZEBOV применялась для первичной вакцинации, а MVA-BN-Filo – для ревакцинации через 56 сут. Выбор векторов вакцин определяется их коммерческой доступностью [5] и благоприятным профилем безопасности MVA [6]. Поскольку MVA-BN-Filo индуцирует относительно слабый иммунный ответ при первичной иммунизации, данный вектор используется преимущественно для гетерологичной ревакцинации, обеспечивая экспрессию целевых белков и выработку вируснейтрализующих антител [7]. Данная схема была одобрена ВОЗ и ЕМА в 2020 г. для экстренной профилактики лихорадки Эбола; дальнейшие КИ препарата были продолжены [4].

### Клинические исследования вакцины у различных групп населения

Первое КИ фазы III (NCT02509494) было проведено в Сьерра-Леоне в 2015–2016 гг. [8] на 106 взрослых добровольцах: Ad26.ZEBOV вводили внутримышечно в дозе  $5 \times 10^{10}$  вирусных частиц (в.ч.); ревакцинация через 56 сут MVA-BN-Filo внутримышечно в дозе  $1 \times 10^8$  БОЕ. Через 7 и 28 сут после каждой иммунизации отмечены легкие нежелательные явления после введения каждой из вакцин (головная боль, утомление, миалгия, артралгия, снижение уровня гемоглобина). Иммунный ответ оценивали методом ИФА по уровню антител к GP вируса Эбола. Отмечено формирование антител уже после первичной вакцинации у 65% добровольцев (средняя геометрическая концентрация, GMC=269 EU/мл), а после ревакцинации – у 98% (GMC=3810 EU/мл). Через год антитела выявлялись у 77% участников (GMC=325 EU/мл) [8]. Сходная динамика наблюдалась по уровню вируснейтрализующих антител (тест *in vitro* [8]): после первичной вакцинации антитела выявлялись у 2% добровольцев, а через 21 сут после ревакцинации – у 98%; через год – у 77% добровольцев, а через два – у 68%. Таким образом, двухкомпонентная схема вакцинации показала высокую безопасность и иммуногенность, индуцируя как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. После одобрения ЕМА в 2020 г. схемы для профилактики заболеваний у лиц в эпидемических очагах она была рекомендована к применению у взрослых и детей в возрасте от 1 года и старше<sup>4</sup>.

Поскольку уровень антител к GP вируса Эбола со временем снижается, было проведено КИ для оценки иммунного ответа после

<sup>4</sup> Zabdeno. EPAR – product information. EMA; 2020.

ревакцинации [8]. Добровольцы после курса вакцинации (Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo с интервалом 56 сут) через 2 года получали вторично дозу Ad26.ZEBOV. В ходе КИ отмечались легкие нежелательные явления, аналогичные таковым при первичной иммунизации (головная боль, утомление, миалгия, артралгия, снижение уровня гемоглобина). Иммуный ответ на ревакцинацию оценивали на 7 и 21 сут. К 7 сут у 96% добровольцев наблюдалось значительное повышение титра антител (показатель GMC вырос в 40 раз – с 279 до 11166 EU/мл). К 21 сут антитела выявлялись у всех добровольцев (GMC=30411 EU/мл, рост более чем в 110 раз). С течением времени титр антител постепенно снижался, однако через 1 и 2 года их уровень оставался в 9 раз выше, чем через аналогичный период после первичной двухкомпонентной иммунизации. Эти данные свидетельствуют, что схема иммунизации Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo с интервалом 56 сут формирует иммунологическую память, способную к быстрой реактивации при контакте с вирусом [8].

#### **Вакцинация во время беременности**

Беременные женщины относятся к группе высокого риска при заражении лихорадкой Эбола. Для оценки безопасности, иммуногенности и реактогенности двухкомпонентной схемы вакцинации в группе беременных женщин было проведено КИ фазы III (NCT02509494) [12, 13]. Показано, что частота самопроизвольных выкидышей (13,9%) соответствовала показателям для первого триместра беременности у невакцинированных женщин. Повышение температуры наблюдалось у 1% женщин. Пик уровня антител к GP вируса Эбола отмечался на 21 сут после введения второго компонента, и иммунный ответ сохранялся в течение 1–2 лет. У 75 новорожденных оценивали уровень материнских антител, переданных трансплацентарно. Установлена зависимость между сроком вакцинации матери и титром антител у ребенка: чем раньше в течение беременности была проведена вакцинация матери, тем выше был титр антител у ребенка к моменту рождения [12, 13]. Это связано с тем, что активный перенос IgG от матери к плоду начинается с конца I триместра (примерно с 13 нед.) [14]. При вакцинации в ранние сроки у матери успевает сформироваться высокий уровень антител к началу этого процесса. Антитела классов IgA, IgG и IgM секретировались в грудное молоко.

Таким образом, на основании данных КИ, проведенных в Европе, США и Африке (764 участниц в возрасте 18–50 лет), вакцинация

рекомендуется во втором и третьем триместрах беременности [12, 13].

#### **Вакцинация пациентов с ВИЧ-инфекцией**

Учитывая высокую распространенность ВИЧ-инфекции в эндемичных по лихорадке Эбола регионах, было проведено КИ фазы II (NCT02509494) для оценки двухкомпонентной схемы вакцинации у данной группы [15]. В сравнительное КИ были включены 668 здоровых взрослых добровольцев (возраст 18–70 лет) и 142 ВИЧ-инфицированных добровольца (возраст 18–50 лет). Проводилась оценка вакцинации с разным интервалом между первичной вакцинацией и ревакцинацией: 28, 56, 84 сут для здоровых добровольцев и 28, 56 сут – для ВИЧ-инфицированных. Определялась безопасность, переносимость и иммуногенность схем вакцинации и ревакцинации (на 365 сут). Оценка безопасности показала, что при введении первичной вакцины (Ad26.ZEBOV) наблюдались нежелательные явления легкой и средней степени тяжести у 54,9% здоровых добровольцев и у 58,5% ВИЧ-инфицированных; при ревакцинации (MVA-BN-Filo) – у 57,2% здоровых добровольцев и у 43,6% ВИЧ-инфицированных. Нежелательные явления отмечены в виде болезненности в месте введения, головной боли, усталости, лихорадки и миалгии. При ревакцинации реактогенность не отличалась от таковой при первичной вакцинации. Один летальный случай у ВИЧ-инфицированного участника не был связан с вакцинацией.

Иммуногенность после первичной вакцинации оценивалась на 29, 57 и 85 сут перед ревакцинацией по уровню В-клеточного иммунного ответа (в ИФА по титру антител, специфичных к GP вируса Эбола) [8]. В группе здоровых добровольцев с интервалом 28, 56 и 84 сут антитела были выявлены у 77% (GMC=332 EU/мл), 80% (GMC=361 EU/мл) и 81% (GMC=242 EU/мл) участников соответственно. После первичной вакцинации наблюдалось значительное повышение GMC: 3085 EU/мл (28 сут, 98% участников), 7518 EU/мл (56 сут, 99% участников) и 7300 EU/мл (85 сут, 100% участников). Через год антитела сохранялись у 80, 78 и 88% добровольцев (для интервалов 28, 56, 84 сут соответственно) при значениях GMC от 313 до 363 EU/мл. Ревакцинация приводила к увеличению концентрации антител у здоровых добровольцев (на 28 сут GMC=29 315 EU/мл, на 56 сут GMC=41 643 EU/мл) [8].

У ВИЧ-инфицированных добровольцев показатели индуцированного иммунного ответа были сопоставимы с таковыми у здоровых участников КИ: после первичной вакцинации

для интервала 28 сут – 81% добровольцев (GMC=368 EU/мл), для интервала 56 сут – 88% (GMC=291 EU/мл); после ревакцинации для интервала 28 сут – 100% (GMC=4 207 EU/мл), для интервала 56 сут – 100% (GMC=5 283 EU/мл) [15]. Через год антитела сохранялись у 86% (GMC=459 EU/мл) и 88% (GMC=338 EU/мл) добровольцев при интервалах 28 и 56 сут соответственно. Таким образом, ревакцинация MVA-BN-Filo приводила к увеличению концентрации антител и у ВИЧ-инфицированных добровольцев, однако при интервале между первичной вакцинацией и ревакцинацией в 56 сут показатель GMC был ниже, чем у здоровых добровольцев [15].

В отдельном исследовании (NCT02509494) оценивались более короткие схемы иммунизации за счет уменьшения интервала между первичной вакцинацией и ревакцинацией до 14 или 28 сут [16]. В слепом рандомизированном плацебо-контролируемом КИ фазы II участвовали 249 здоровых и 250 ВИЧ-инфицированных добровольцев в возрасте 18–70 лет (средний возраст 33,4 года). ВИЧ-инфицированные добровольцы получали антивирусную терапию. Доза Ad26.ZEBOV –  $5 \times 10^{10}$  в.ч. и MVA-BN-Filo –  $1 \times 10^8$  БОЕ. Две группы добровольцев (здоровые и ВИЧ-инфицированные) были разделены на 2 подгруппы, с разными интервалами между первичной вакцинацией и ревакцинацией (14 и 28 сут) [16]. Нежелательные явления во всех группах (независимо от ВИЧ-статуса добровольцев) были легкой или средней степени тяжести и проявлялись в первые 3 сут в виде боли и зуда в месте введения, а на 2–4 сут в виде головной боли, миалгии и лихорадки.

Через 21 сут после иммунизации второй вакциной антитела к GP вируса Эбола (ИФА) были выявлены у 99% здоровых и 98% ВИЧ-инфицированных добровольцев при схеме с интервалом 14 сут [16]. У здоровых добровольцев значение GMC составило 5168 EU/мл, а у ВИЧ-инфицированных – 2509 EU/мл. У 98% добровольцев обеих групп, иммунизированных по второй схеме (интервал 28 сут), регистрировались антитела с GMC, равным 6037 EU/мл у здоровых добровольцев и 2939 EU/мл у ВИЧ-инфицированных. Через год уровень GMC снизился до 635 EU/мл у здоровых добровольцев и 514 EU/мл у ВИЧ-инфицированных (схема с интервалом 14 сут) и до 331 и 360 EU/мл (схема с интервалом 28 сут) соответственно. Иммунный ответ сохранялся в течение 3,8 года после введения первого компонента. Анализ клеточного

иммунитета у добровольцев показал формирование GP-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, продуцирующих интерферон гамма (IFN- $\gamma$ ): CD4<sup>+</sup> Т-клетки обнаруживались на 21 сут у 26–32% добровольцев, через 1 год – 0–25% при интервале 14 сут; на 21 сут – 41–52%, через 1 год – 23–49% при интервале 28 сут; CD8<sup>+</sup> Т-клетки обнаруживались на 21 сут у 5–21% добровольцев и через 1 год – 5–13%.

Таким образом, применение ускоренных схем в режиме вакцинации-ревакцинации индуцировало иммунный ответ как у здоровых добровольцев, так и у ВИЧ-инфицированных лиц, формируя иммунную память, способную к быстрой реактивации при контакте с вирусом Эбола [17].

#### **Влияние на вакцинацию сопутствующих инфекций (малярия и гельминтозы)**

Поскольку вспышки лихорадки Эбола происходят в регионах, эндемичных по малярии (95% случаев заболевания малярией<sup>5</sup>), изучалось влияние этого заболевания на вакцинацию. Известно, что малярия может ослаблять иммунный ответ на некоторые вакцины (против столбняка, *Haemophilus influenzae*, менингококка) вследствие нарушения функции В-клеток памяти [18]. Однако малярия не снижала иммуногенность вакцин на основе вирусоподобных частиц HPV-16/18 [19] и рекомбинантной векторной вакцины rVSV-ZEBOV-GP [20]. В исследовании D. Ishola с соавт. [21] показано, что у детей 1–3 лет с бессимптомным течением малярии после первой дозы вакцины Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo титры антител к GP вируса Эбола были ниже, чем у здоровых детей, однако после введения второй дозы различия нивелировались. Эти данные указывают на необходимость дальнейшего изучения влияния малярии на формирование поствакцинального иммунитета.

Исследование в Сьерра-Леоне в регионе, эндемичном по малярии (КИ фазы II, NCT02509494, 2015–2018 гг.), включало две стадии [22]. На первой стадии КИ проводили иммунизацию небольшой группы взрослых добровольцев по двухкомпонентной схеме [14]. На втором этапе участвовало 188 взрослых добровольцев и 399 детей, разделенных на 3 возрастные группы (1–3 года – 125, 4–11 лет – 133 и 12–17 лет – 141 человек). Участников также категоризировали по времени заражения малярией: перед, во время и после вакцинации (но до оценки иммуногенности). Сравнивали иммунный ответ у добровольцев, зараженных малярией, и у здоровых одной возрастной категории.

<sup>5</sup> World malaria report 2024. WHO; 2024.

Различий в уровне антител к GP вируса Эбола после первой (57 сут) и второй дозы вакцины (78 сут) обнаружено не было. Однако у взрослых добровольцев, заразившихся во время вакцинации (между 1 и 57 сут), наблюдалось небольшое снижение концентрации антител. На 21 сут после второй дозы вакцины показатели почти не различались. В других возрастных группах явных различий не наблюдалось. Таким образом, зараженность малярией при иммунизации Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo не влияет на выработку антител к GP вируса Эбола, что исключает необходимость отбора добровольцев по этому признаку.

При двухкомпонентной вакцинации у европейских добровольцев уровень антител к GP вируса Эбола был в среднем на 23% выше, чем у западноафриканских добровольцев. В качестве одной из возможных причин снижения эффективности вакцинации рассматривалось наличие гельминтозов [23], распространенность которых составляет 10–60% [24].

Для оценки влияния гельминтозов на вакцинацию проведено рандомизированное слепое плацебо-контролируемое КИ фазы II (NCT02509494) с участием 367 добровольцев (взрослые 18–70 лет, подростки 12–17 лет, дети 6–11 лет) [25], у которых отмечалось наличие хотя бы одного вида гельминтов. Вакцины вводились с интервалом между первичной вакцинацией и ревакцинацией 28, 56 и 84 сут. Результаты показали отсутствие связи между гельминтозом и уровнем специфического иммунного ответа к вирусу Эбола. Более низкий уровень иммунного ответа у добровольцев из африканских стран, по-видимому, обусловлен комплексом причин, включая генетические особенности, состояние окружающей среды, демографию, наличие паразитарных инфекций и предсуществующий иммунитет к вирусным векторам [25].

#### **Иммуногенность и безопасность вакцины у детей и подростков**

Дети составляли около 20% от заболевших лихорадкой Эбола, причем у детей младше 5 лет болезнь прогрессировала быстрее, чем у взрослых, и с более высоким риском для жизни, что обусловило необходимость разработки схем вакцинации у детей [26]. В настоящее время схема, утвержденная EMA<sup>6</sup>, применяется как для взрослых, так и для детей от 1 года и старше [27, 28]. С учетом снижения поствакцинального иммунитета со временем было проведено КИ фазы II (NCT02509494)

для оценки безопасности и иммуногенности ревакцинации Ad26.ZEBOV, проводимой не ранее чем через 2 года после первичного курса Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo.

В 2021 г. в открытом нерандомизированном исследовании в Сьерра-Леоне участвовали 50 здоровых детей 1–11 лет, ранее получивших полный курс вакцинации [26]. При ревакцинации Ad26.ZEBOV участники были разделены на 2 группы: 1–3 года и 4–11 лет (на момент первичной вакцинации). Дозу вакцины Ad26.ZEBOV ( $5 \times 10^{10}$  в.ч.) вводили не менее чем через 3 года после первичной вакцинации. Нежелательные явления были легкой степени тяжести (боль и зуд в месте введения вакцины, головная боль, утомление, озноб, лихорадка) и проходили через 3 сут; снижение уровня гемоглобина нормализовалось к 10 сут.

Перед ревакцинацией показатель GMC составлял 640 EU/мл в общей группе, 934 EU/мл у детей 1–3 лет и 416 EU/мл у детей 4–11 лет. Через 7 сут после ревакцинации показатель GMC возрастал до 28561 EU/мл (общая группа), при этом в группе 1–3 лет его значение увеличилось в 32 раза, до 30463 EU/мл, а в группе 4–11 лет – в 63 раза, до 26478 EU/мл. Через 21 сут показатель GMC достигал 64690 EU/мл (общая группа), в группе 1–3 лет – до 71143 EU/мл (в 76 раз), в группе 4–11 лет – до 57564 EU/мл (в 137 раз). Эти данные показывают, что ревакцинация Ad26.ZEBOV вызывает значительное повышение количества антител против GP вируса Эбола, оцениваемых в ИФА [26]. Следует отметить, что титры нейтрализующих антител в данном исследовании не определялись.

В многоцентровом рандомизированном плацебо-контролируемом КИ фазы II (NCT02509494; 2016–2018 гг.) оценивали безопасность, переносимость и иммуногенность двухкомпонентной схемы вакцинации у здоровых детей и подростков в Африке [28]. В исследовании принимали участие 131 подросток (11–17 лет; средний возраст 14 лет) и 132 ребенка (4–11 лет; средний возраст 7 лет). Дозы составляли  $5 \times 10^{10}$  в.ч. Ad26.ZEBOV и  $1 \times 10^8$  БОЕ MVA-BN-Filo. Оценивали схемы вакцинации при интервалах между первичной вакцинацией и ревакцинацией в 28 и 56 сут.

Нежелательные явления (болезненность в месте введения, головная боль, лихорадка) чаще наблюдались при введении Ad26.ZEBOV как у подростков, так и у детей и не зависели от интервала между первичной вакцинацией и ревакцинацией.

<sup>6</sup> Zabdeno. EPAR – product information. EMA; 2020.

Антитела к GP вируса Эбола (ИФА) у подростков после ведения Ad26.ZEBOV определялись у 93% (группа с интервалом 28 сут) и у 94% (группа с интервалом 56 сут) участников [28]. Через 21 сут после ревакцинации MVA-BN-Filo антитела были выявлены у 100% подростков; GMC составили 6,993 EU/мл (интервал 28 сут) и 13,532 EU/мл (интервал 56 сут). Через год антитела сохранялись у 92% (группа с интервалом 28 сут) с GMC, равным 593 EU/мл, и у 90% подростков (группа с интервалом 56 сут) с GMC – 541 EU/мл. У детей антитела к GP вируса Эбола после ведения Ad26.ZEBOV определялись у 96% (группа с интервалом 28 сут) и у 98% (группа с интервалом 56 сут). Через 21 сут после ревакцинации MVA-BN-Filo антитела регистрировались у 100% детей с GMC 8007 EU/мл и 17 388 EU/мл в группах с интервалами 28 и 56 сут соответственно, что незначительно отличалось от показателей в группах подростков. Через год антитела детектировались у 96% (группа с интервалом 28 сут) и у 95% детей (группа с интервалом 56 сут) с GMC, равными 981 и 637 EU/мл соответственно [28].

Нейтрализующие антитела после ревакцинации MVA-BN-Filo регистрировались у подростков через 21 сут у 96% (группа с интервалом 28 сут) и у 100% (группа с интервалом 56 сут) с GMC, равными 1879 и 6403 IC<sub>50</sub> соответственно. Через год нейтрализующие антитела определялись у 54% (группа с интервалом 28 сут; GMC=218 IC<sub>50</sub>) и у 44% подростков (группа с интервалом 56 сут; GMC=275 IC<sub>50</sub>). Отмечена корреляция между уровнем антител в ИФА и уровнем нейтрализующих антител к GP вируса Эбола [28].

Помимо антител к GP вируса Эбола формировался гуморальный и клеточный иммунитет к аденовирусу (Ad26.VNA). Наличие предсуществующего иммунитета к аденовирусу у подростков и детей не препятствовало формированию антител к GP вируса Эбола.

Таким образом, двухкомпонентная схема иммунизации Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo индуцирует у детей и подростков иммунный ответ к GP вируса Эбола, причем интервал 56 сут между дозами обеспечивал более высокие показатели иммуногенности по сравнению с интервалом 28 сут. Схема вакцинации характеризовалась благоприятным профилем безопасности [28].

В клиническом исследовании фазы II (NCT02509494; 2019 г.) оценивали безопасность и иммуногенность вакцины у детей младше 1 года [27]. Дети были рандомизированы 1:1 для иммунизации либо Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo (подгруппы 4–8 и 9–11 мес.), либо менингококковой вакциной (контрольная группа) [29]. Было

показано, что схема Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo продемонстрировала хорошую переносимость: нежелательные явления были легкой или умеренной степени тяжести (болезненность в месте введения, снижение аппетита, кратковременная лихорадка и снижение активности) и сопоставимы с таковыми у детей других возрастных групп [27]. Серьезных нежелательных явлений, связанных с вакцинацией, не зафиксировано.

Двухкомпонентная схема вакцинации индуцировала повышение уровня антител к GP вируса Эбола (ИФА) у 100% младенцев через 21 сут после введения второй дозы [29]. Уровень антител сохранялся через 12 мес. у 93% детей возрастной подгруппы 4–8 мес. и 100% – подгруппы 9–11 мес. Предсуществующий иммунитет к аденовирусу (по титру нейтрализующих антител) не влиял на формирование иммунного ответа. Титры антител у младенцев были сопоставимы с таковыми у детей в возрасте 1–3 лет в Сьерра-Леоне [27, 29]. Показатели GMC у младенцев через 21 сут после введения второго компонента и через 12 мес. после введения первого компонента были выше, чем у детей в возрасте от 4 до 11 лет и у подростков в возрасте 12–17 лет согласно данным ранее проведенного КИ [28, 29]. Выявлена обратная зависимость между возрастом и уровнем иммунного ответа: с уменьшением возраста значения GMC повышались [29].

Наблюдались географические различия в уровне иммунного ответа на вакцинацию. Показатели GMC у младенцев (подгруппа 4–8 мес.) в Уганде были выше по сравнению с участниками аналогичного возраста из Сьерра-Леоне [29]. Более высокие показатели GMC (после введения второго компонента) отмечались у детей в возрасте 4–11 лет и подростков 12–17 лет в Буркина-Фасо по сравнению с их сверстниками из Кот-д'Ивуара, Кении и Уганды [29].

Представленные результаты исследований свидетельствуют о безопасности и иммуногенности вакцины у детей и подростков, обосновывая возможность ее включения в национальные календари прививок в соответствии с рекомендациями ЕМА по применению двухкомпонентной схемы вакцинации для взрослых и детей старше 1 года [8].

В *таблице 1* суммированы данные КИ по количественным показателям иммунного ответа после вакцинации двухкомпонентной вакциной Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo у различных групп населения. Качественные показатели по особым группам (беременные, лица с сопутствующими инфекциями, младенцы) представлены в *таблице 2*.

**Таблица 1.** Показатели иммунного ответа, индуцированного двухкомпонентной вакциной Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo у здоровых взрослых добровольцев, ВИЧ-инфицированных, здоровых детей и подростков  
**Table 1.** Immune response induced by two-dose Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo vaccine in healthy adults, HIV-infected patients, healthy children, and adolescents

№	Статус добровольцев <i>Volunteer group</i>	Количество добровольцев с антителами* после первичной вакцинации, % <i>Quantity of volunteers with binding antibodies after primary vaccination, %</i>	Концентрация антител (ГМС) после первичной вакцинации, ЕУ/мл <i>Concentration of antibodies (GMC) after primary vaccination, EU/mL</i>	Количество добровольцев с антителами после ревакцинации, % <i>Quantity of volunteers with binding antibodies after boosting, %</i>	Концентрация антител (ГМС) после ревакцинации, ЕУ/мл <i>Concentration of antibodies (GMC) after boosting, EU/mL</i>	Интервал между вакцинацией и ревакцинацией, сут <i>The interval between primary vaccination and revaccination, days</i>	Ревакцинация <i>Revaccination</i>		Интервал до ревакцинации <i>Interval until revaccination</i>	Исследование, фаза <i>Trial phase</i>
							Количество добровольцев с антителами, % <i>Quantity of volunteers with binding antibodies, %</i>	Концентрация антител (ГМС), ЕУ/мл <i>Concentration of antibodies, GMCs, EU/mL</i>		
1	Здоровые взрослые <i>Healthy adults</i>	65	269	98	38120	56	100	30411	2 года <i>2 years</i>	Фаза II <i>Phase II</i> NCT02509494
		77	332	98	3085	28	80			
2	Здоровые взрослые <i>Healthy adults</i>	80	361	99	7518	56	78	313–361	1 год <i>1 year</i>	Фаза II <i>Phase II</i> NCT02509494
		81	2421	100	7300	84	88			
		81	368	100	4207	28	86	459		
		88	291	100	5283	56	88	338		
3	ВИЧ-инфицированные взрослые <i>HIV-infected adults</i>	16	Нет данных <i>Not available</i>	98	2509	14			Не определяли <i>Not determined</i>	Не определяли <i>Not determined</i>
		82		98	2939	28				
				99	5168	14				
				99	6037	28				

Продолжение таблицы 1  
 Table 1 (continued)

№	Статус добровольцев Volunteer group	Количество добровольцев с антителами* после первичной вакцинации, % Quantity of volunteers with binding antibodies after primary vaccination, %	Концентрация антител (ГМС) после первичной вакцинации, ЕУ/мл Concentration of antibodies (GMC) after primary vaccination, EU/mL	Количество добровольцев с антителами после ревакцинации, % Quantity of volunteers with binding antibodies after boosting, %	Концентрация антител (ГМС) после ревакцинации, ЕУ/мл Concentration of antibodies (GMC) after boosting, EU/mL	Интервал между первичной вакцинацией и ревакцинацией, сут The interval between primary vaccination and revaccination, days	Ревакцинация Revaccination		Интервал до ревакцинации Interval until revaccination	Исследование, фаза Trial phase
							Количество добровольцев с антителами, % Quantity of volunteers with binding antibodies, %	Концентрация антител (ГМС), ЕУ/мл Concentration of antibodies, GMCs, EU/mL		
4	Здоровые дети (общая группа) Healthy children in the whole group	Нет данных Not available	Нет данных Not available	Нет данных Not available	640	Нет данных Not available	64690	Нет данных Not available	3,2 года 3.2 years	Фаза II Phase II NCT02509494
		Нет данных Not available	Нет данных Not available	Нет данных Not available	934	Нет данных Not available	71143	Нет данных Not available		
		Нет данных Not available	Нет данных Not available	Нет данных Not available	416	Нет данных Not available	57564	Нет данных Not available		
5	Здоровые подростки Healthy adolescents	93	Нет данных Not available	100	6993	28	593	92	1 год 1 year	Фаза II Phase II NCT02509494
		94	Нет данных Not available	100	13532	56	541	90	Нет данных Not available	
	Здоровые дети Healthy children	96	Нет данных Not available	100	8007	28	Не определяли Not determined	Не определяли Not determined	Нет данных Not available	Нет данных Not available
		98	Нет данных Not available	100	17388	56	Нет данных Not available	Нет данных Not available	Нет данных Not available	

Таблица составлена авторами / The table was prepared by the authors

Примечание. \* антитела регистрировали с использованием ИФА. ГМС, среднее геометрическое значение концентрации антител, измеряемое в единицах ИФА на 1 мл (ЕУ/мл).  
 Notes. \* antibodies were detected using ELISA. GMC, geometric mean concentrations of antibodies measured in ELISA units per 1 mL (EU/mL).

## Безопасность вакцины в условиях массовой вакцинации

В масштабной программе UMURINZI (NCT04556526; 2019–2021 гг.) по исследованию двухкомпонентной схемы вакцинации Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo оценивались нежелательные явления после иммунизации первой дозой (Ad26.ZEBOV). В программе принимали участие 216113 пациентов из Руанды (район, пограничный с Демократической Республикой Конго): взрослые пациенты, подростки и дети старше 1 года без серьезных хронических заболеваний [30]. Выявлено, что после первичной вакцинации отмечались нежелательные явления легкой и средней степени тяжести (в основном лихорадка, головная боль) у 0,7% взрослых пациентов, у 1,2% детей в возрасте 2–8 лет, у 0,4% детей в возрасте 9–17 лет. Серьезные нежелательные явления (угрожающие жизни) зафиксированы у 174 человек (0,04%), включая фебрильные судороги у 10 детей (7 лет и младше) сразу после вакцинации, которые проходили при медикаментозном лечении в течение 48 ч. Данная реакция ранее не регистрировалась при рутинной вакцинации. Отмечены 7 случаев тяжелых нежелательных явлений (лихорадка, рвота, и/или диарея) у детей старше 8 лет. Все 20 зарегистрированных летальных исходов не были связаны с иммунизацией.

Таким образом, для схемы вакцинации с использованием Ad26.ZEBOV и MVA-BN-Filo с интервалом 56 сут подтвержден благоприятный профиль безопасности и эффективности.

В проведенных КИ показано формирование устойчивого иммунитета у различных групп населения, включая взрослых, детей, беременных, ВИЧ-инфицированных, а также у лиц с малярией и гельминтозами. Иммунный ответ сохранялся до трех лет, а повторная вакцинация значительно повышала уровень антител, что свидетельствует о формировании иммунологической памяти. Представленные результаты исследований позволяют рекомендовать включение препарата в национальные календари профилактических прививок.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Двухкомпонентная схема вакцинации против лихорадки Эбола, предусматривающая первичную вакцинацию Ad26.ZEBOV с последующей ревакцинацией MVA-BN-Filo (с интервалом 56 сут), одобрена ВОЗ и ЕМА для применения у лиц в эпидемических очагах, включая взрослых и детей старше одного года. Безопасность и эффективность вакцины подтверждены в серии клинических исследований с участием различных групп населения: здоровые взрослые; беременные женщины; младенцы, дети и подростки; лица с ВИЧ-инфекцией, малярией и гельминтозами.

Схема вакцинации характеризуется благоприятным профилем безопасности. Нежелательные явления были легкой и средней степени тяжести (болезненность в месте введения, головная боль, утомление, лихорадка, миалгия, артралгия, снижение уровня гемоглобина)

Таблица 2. Показатели иммунного ответа у особых групп населения

Table 2. Immune response in specific patient groups

№	Статус добровольцев <i>Volunteer group</i>	Уровень иммунного ответа (ИФА) после первичной вакцинации <i>Immune response level in ELISA after primary vaccination</i>	Уровень иммунного ответа (ИФА) после ревакцинации <i>Immune response level in ELISA after revaccination</i>	Исследование, фаза <i>Trial phase</i>
1	Беременные женщины <i>Pregnant women</i>	Нет данных <i>Not available</i>	Наличие антител, пиковая концентрация антител определялась в первом триместре <i>Presence of antibodies and peak antibodies in the first trimester</i>	Фаза III <i>Phase III</i> NCT02509494
2	Больные малярией <i>Patients with malaria</i>	Концентрация антител была меньше, чем у здоровых добровольцев <i>Concentration of lower smaller than in healthy volunteers</i>	Концентрация антител через 1 год не отличалась от здоровых добровольцев <i>Concentration of antibodies after one year equal to healthy volunteers</i>	Фаза II <i>Phase II</i> NCT02509494
3	Больные гельминтозами <i>Patients with helminthiasis</i>	Нет данных <i>Not available</i>	Концентрация антител ниже, чем у здоровых добровольцев. Через 1 год концентрация антител не отличалась от здоровых добровольцев <i>Concentration of antibodies lower than in healthy adult volunteers. Concentration of antibodies after one year equal to healthy volunteers</i>	Фаза II <i>Phase II</i> NCT02509494
4	Младенцы до 1 года <i>Infants under one year</i>	93–100%	100%	Фаза II <i>Phase II</i> NCT02509494

Таблица составлена авторами / The table was prepared by the authors

и проходили через 3 сут после вакцинации. Продемонстрирована безопасность вакцинации у беременных женщин. Иммуный ответ у здоровых добровольцев после двухкомпонентной вакцинации сохранялся на высоком уровне в течение года и удерживался на протяжении трех лет. Ревакцинация вызывала резкое увеличение уровня антител, что свидетельствует о наличии иммунологической памяти, способной активироваться при естественном инфицировании вирусом Эбола.

Результаты исследований показали, что схема вакцинации эффективна у ВИЧ-инфицированных лиц, хотя пиковые концентрации антител у них были примерно в два раза ниже, чем у здоровых участников. Изменение интервала между первичной вакцинацией и ревакцинацией не оказывало существенного влияния на характеристики иммунного ответа. Наличие малярии

или гельминтозов у иммунизированных лиц не оказывало значимого влияния на формирование поствакцинального иммунитета по сравнению со здоровыми участниками исследований.

При иммунизации вакциной детей и подростков нежелательные явления (боль и зуд в месте введения, головная боль, утомление, озноб, лихорадка, снижение уровня гемоглобина) были сопоставимы с таковыми у взрослых.

Таким образом, двухкомпонентная схема вакцинации Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo является безопасной и иммуногенной для различных групп населения, включая особые группы. Применение данной схемы вакцинации способно существенно снизить риск распространения лихорадки Эбола и может рассматриваться как элемент стратегических программ массовой иммунизации в эндемичных регионах и при вспышках заболевания.

## Литература/References

1. Dembek Z, Kortepeter MG, Pavlin JA, et al. Ebola virus disease outbreaks: Lessons learned from past and facing future challenges. *Mil Med.* 2024;189(7–8):e1470–8. <https://doi.org/10.1093/milmed/usae204>
2. Collier B-A, Lapps W Jr, Yunus M, et al. Lessons learned from the development and roll-out of the rVSVΔG-ZEBOV-GP Zaire ebolavirus vaccine to inform Marburg virus and Sudan ebolavirus vaccines. *Vaccines (Basel).* 2022;10(9):1446. <https://doi.org/10.3390/vaccines10091446>
3. Agnandji ST, Huttner A, Zinser M, et al. Phase I trials of rVSV Ebola vaccine in Africa and Europe. *N Engl J Med.* 2016;374(17):1647–56. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502924>
4. PREVAC Study Team, Kieh M, Richert L, Beavogui AH, et al. Randomized trial of vaccines for Zaire Ebola virus disease. *N Engl J Med.* 2022;387(26):2411–24. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2200072>
5. Chang J. Adenovirus vectors: Excellent tools for vaccine development. *Immune Netw.* 2021;21(1):e6. <https://doi.org/10.4110/in.2021.21.e6>
6. Стовба ЛФ, Чухраля ОВ, Черникова НК и др. Безопасность и иммуногенность вакцины третьего поколения IMVAMUNE® на основе вируса вакцины, штамм MVA. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;23(1):26–41. Stovba LF, Chukhrayla OV, Chernikova NK, et al. Safety and immunogenicity of IMVAMUNE®, a third-generation vaccine based on the modified vaccinia Ankara (MVA) strain. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2023;23(1):26–41 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-26-41>
7. Стовба ЛФ, Чухраля ОВ, Павельев ДИ и др. Сравнение эффективности различных схем применения рекомбинантных векторных вакцин против лихорадки Эбола на основе вируса вакцины, штамм MVA. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023;(4):24–31. Stovba LF, Chukhrayla OV, Paveliev DI, et al. Comparison of the efficacy of different schemes for using recombinant vector vaccines against Ebola fever, based on Vaccinia virus, MVA strain. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2023;(4):24–31 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-4-24-31>
8. Ishola D, Manno D, Afolabi MO, et al. Safety and longterm immunogenicity of the twodose heterologous Ad26.ZEBOV and MVABN-Filo Ebola vaccine regimen in adults in Sierra Leone: a combined openlabel, nonrandomised stage 1, and a randomised, double-blind, controlled stage 2 trial. *Lancet Infect Dis.* 2022;22(1):97–109. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00125-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00125-0)
9. Чепурнов АА, Чернухин ИВ, Терновой ВА и др. Попытки разработать вакцину против лихорадки Эбола. *Вопросы вирусологии.* 1995;40(6):257–260. Chepurnov AA, Chernukhin IV, Ternovoy VA, et al. Attempts to develop a vaccine against Ebola fever. *Problems of Virology.* 1995;40(6):257–60 (In Russ.). EDN: [VVADEW](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1215302)
10. Zhu W, Banadyga L, Emeterio K, et al. The roles of Ebola Virus soluble glycoprotein in replication, pathogenesis, and countermeasure development. *Viruses.* 2019;11(11):999. <https://doi.org/10.3390/v11110999>
11. Volchkova VA, Dolnik O, Martinez MJ, et al. Genomic RNA editing and its impact on Ebola virus adaptation during serial passages in cell culture and infection of guinea pigs. *Infect Dis.* 2011;204(Suppl. 3):S941–6. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir321>
12. Kachikis A, Englund JA. Maternal immunization: optimizing protection for the mother and infant. *J Infect.* 2016;72(Suppl):S83–90. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.04.027>
13. Calvert A, Jones CE. Placental transfer of antibody and its relationship to vaccination in pregnancy. *Curr Opin Infect Dis.* 2017;30(3):268–73. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000372>
14. Karita E, Nyombayire J, Ingabire R, et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of a 2dose Ebola vaccine regimen of Ad26.ZEBOV followed by MVABN-Filo in healthy adult pregnant women: study protocol for a phase 3 openlabel randomized controlled trial. *Trials.* 2022;23(1):513. <https://doi.org/10.1186/s13063-022-06360-3>
15. Barry H, Mutua G, Kibuuka H, et al. Safety and immunogenicity of 2 dose heterologous Ad26.ZEBOV, MVABN-Filo Ebola vaccination in healthy and HIVinfected adults: a randomised, placebocontrolled Phase II clinical trial in Africa. *PLoS Med.* 2021;18(10):e1003813. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003813>
16. Mwesigwa B, Sawe F, Oyieko J, et al. Safety and immunogenicity of accelerated heterologous-dose Ebola vaccine regimens in adults with and without HIV in Africa. *Clin Infect Dis.* 2024;79(4):888–900. <https://doi.org/10.1093/cid/ciae215>
17. McLean C, Dijkman K, Gaddah A, et al. Persistence of immunological memory as a potential correlate of longterm, vaccineinduced protection against Ebola virus disease in humans. *Front Immunol.* 2023;14:1215302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1215302>
18. Portugal S, Tipton CM, Sohn H, et al. Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. *eLife.* 2015;4:e07218. <https://doi.org/10.7554/eLife.07218>
19. Nakalembe M, Banura C, Namujju PB, Mirembe FM. Immunogenicity to the bivalent HPV16/18 vaccine among adolescent African students exposed to helminths and malaria. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9(2):197–205. <https://doi.org/10.3855/jidc.5719>
20. Mahon BE, Simon J, Widdowson MA, et al. Baseline asymptomatic malaria infection and immunogenicity of recombinant vesicular stomatitis virus – Zaire Ebola virus envelope glycoprotein. *J Infect*

- Dis. 2021;224(11):1907–15.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiab243>
21. Ishola D, EBOVAC-Salone Malaria Infection Sub-Study Team. Asymptomatic malaria infection and the immune response to the 2-dose Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo Ebola vaccine regimen in adults and children. *Clin Infect Dis*. 2022;75(9):1585–93.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciac209>
  22. Manno D, Patterson C, Drammeh A, et al. The effect of previous exposure to malaria infection and clinical malaria episodes on the immune response to the twodose Ad26.ZEBOV, MVABNFilo Ebola vaccine regimen. *Vaccines*. 2023;11(8):1317.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines11081317>
  23. Cooper PJ, Chico M, Sandoval C, et al. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103HgR. *Infect Immun*. 2001;69(3):1574–80.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1574-1580.2001>
  24. Loukouri A, Méité A, Kouadio OK, et al. Prevalence, intensity of soiltransmitted helminths, and factors associated with infection: importance in control program with ivermectin and albendazole in eastern Côte d'Ivoire. *J Trop Med*. 2019;2019:7658594.  
<https://doi.org/10.1155/2019/7658594>
  25. Barry H, Lhomme E, Surénaud M, et al. Helminth exposure and immune response to the twodose heterologous Ad26.ZEBOV, MVABNFilo Ebola vaccine regimen. *PLoS Negl Trop Dis*. 2024;18(4):e0011500.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011500>
  26. Manno D, Bangura A, Baiden F, et al. Safety and immunogenicity of an Ad26.ZEBOV booster dose in children previously vaccinated with the twodose heterologous Ad26.ZEBOV and MVABNFilo Ebola vaccine regimen: an openlabel, nonrandomised, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*. 2023;23(3):352–60.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00594-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00594-1)
  27. Afolabi MO, Ishola D, Manno D, et al. Safety and immunogenicity of the twodose heterologous Ad26.ZEBOV and MVABNFilo Ebola vaccine regimen in children in Sierra Leone: A randomised, doubleblind, controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(1):110–22.  
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00128-6)
  28. Anywaine Z, Barry H, Anzala O, et al. Safety and immunogenicity of 2dose heterologous Ad26.ZEBOV, MVABNFilo Ebola vaccination in children and adolescents in Africa: A randomised, placebocontrolled, multicentre phase II clinical trial. *PLoS Med*. 2022;19(1):e1003865.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003865>
  29. Choi EML, Lacarra B, Afolabi MO, et al. Safety and immunogenicity of the twodose heterologous Ad26.ZEBOV and MVABNFilo Ebola vaccine regimen in infants: a phase 2, randomized, doubleblind, activecontrolled trial in Guinea and Sierra Leone. *Lancet Glob Health*. 2023;11(11):e1743–52.  
[https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(23\)00410-2](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00410-2)
  30. Julien N, Rosine I, Ben M, et al. Monitoring of adverse events in recipients of the 2dose Ebola vaccine regimen of Ad26.ZEBOV followed by MVABNFilo in the UMURINZI Ebola vaccination campaign. *J Infect Dis*. 2023;227(2):268–77. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac283>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Л.Ф. Стовба** – формирование концепции статьи, написание текста рукописи; **О.В. Чухралья** – критический пересмотр текста рукописи; **Д.И. Павельев** – коррекция текста рукописи; **М.И. Солдатенкова** – редактирование текста рукописи; **Д.П. Белозеров** – оформление иллюстративного материала; **А.А. Петров** – анализ данных научной литературы и переработка текста рукописи; **С.В. Борисевич** – сбор и анализ научной литературы, окончательное утверждение статьи для публикации.

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **L.F. Stovba** conceptualized the study and drafted the manuscript. **O.V. Chukhralya** critically reviewed the manuscript. **D.I. Paveliev** corrected the manuscript. **M.I. Soldatenkova** edited the manuscript. **D.P. Belozеров** designed the illustrations. **A.A. Petrov** analyzed scientific literature and revised the manuscript. **S.V. Borisevich** collected and analyzed scientific literature and approved the final version of the manuscript for publication.

## Об авторах / Authors

**Стовба Людмила Федоровна**, канд. биол. наук / **Lyudmila F. Stovba**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7985-5516>

**Чухралья Олег Васильевич**, канд. мед. наук / **Oleg V. Chukhralya**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2603-0860>

**Павельев Дмитрий Игоревич**, канд. мед. наук / **Dmitry I. Paveliev**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3204-1897>

**Солдатенкова Мария Игоревна** / **Maria I. Soldatenkova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7760-6019>

**Белозеров Денис Петрович** / **Denis P. Belozеров**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-1858-8689>

**Петров Александр Анатольевич**, д-р мед. наук / **Alexander A. Petrov**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9714-2085>

**Борисевич Сергей Владимирович**, д-р биол. наук, проф., академик РАН / **Sergey V. Borisevich**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Acad. RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Поступила 13.08.2025

После доработки 09.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Received August 13, 2025

Revised February 9, 2026

Accepted March 13, 2026



## Плазма крови человека в производстве лекарственных средств: национальные особенности в аспекте гармонизации с мировыми фармакопейными требованиями

О.А. Демидова , О.Г. Корнилова , О.В. Муслимова , 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](mailto:demidova@expmed.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Лекарственные препараты (ЛП) на основе плазмы крови человека применяются при лечении ряда системных заболеваний, иммунодефицитных и жизнеугрожающих состояниях. Рост потребления таких ЛП предопределяет масштабирование производств и обеспечение стабильных поставок плазмы крови, качество которой должно соответствовать международным стандартам.

**ЦЕЛЬ.** Систематизация и анализ национальных и международных фармакопейных требований к качеству плазмы крови человека, в том числе используемой для производства ЛП, в рамках гармонизации национальных требований с мировыми стандартами качества и разработка проектов фармакопейных статей.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Анализ нормативных правовых документов и научной литературы показал, что в различных странах частоты донаций плазмы крови в расчете на донора составляют от 24 до 104 раз в год, а допустимые объемы донаций – от 650 до 850 мл. Двухэтапная система отбора доноров по результатам двух последовательных лабораторных исследований обеспечивает высокий уровень вирусной безопасности ЛП, что соответствует требованиям международных стандартов, в том числе стандартов PPTA. В Российской Федерации установленный срок обязательной карантинизации плазмы крови человека составляет 120 сут. В США производители плазмы добровольно внедрили протокол карантинного хранения плазмы в течение 60 сут для дальнейшего производства. Во Франции сроки карантинизации плазмы также составляет 2 мес. Анализ контроля и обеспечения вирусной безопасности индивидуальных донаций, минипула и производственного пула плазмы для фракционирования (ПДФ) на вирусные маркеры в национальных и региональных стандартах качества выявил различные подходы к стандартизации. В Европейской и Индийской фармакопеях предусмотрены испытания индивидуальных донаций плазмы на наличие антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вирусу гепатита С (ВГС) и поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). Свод законов США устанавливает испытания индивидуальных донаций плазмы на наличие HBsAg, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС и нуклеиновых кислот ВИЧ и ВГС. В Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) предусмотрено проведение испытаний каждой индивидуальной донации плазмы на наличие HBsAg, антител к ВГС, антигена р24 ВИЧ-1, антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и возбудителю сифилиса. В рамках гармонизации ГФ РФ с монографиями зарубежных фармакопей установлены требования к качеству плазмы крови человека, в том числе используемой для производства ЛП.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты сравнительного анализа национальных и международных требований к качеству ПДФ и вирусинактивированной плазмы крови человека указали на необходимость создания современных подходов к стандартизации и контролю качества. Подготовлены проекты фармакопейных статей «Плазма человека для фракционирования» и «Плазма человека вирусинактивированная».





**Ключевые слова:** стандартизация; плазма крови человека; доноры; карантинизация; индивидуальные донации; пулы плазмы; вирусная безопасность; фармакопейная статья; гармонизация; Государственная фармакопея Российской Федерации; Европейская фармакопея

**Для цитирования:** Демидова О.А., Корнилова О.Г., Муслимова О.В., Багирова В.Л. Плазма крови человека в производстве лекарственных средств: национальные особенности в аспекте гармонизации с мировыми фармакопейными требованиями. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(1):28–41. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-28-41>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00061-26-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200096-0).

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Human plasma in the production of medicinal products: national differences in terms of harmonization with global compendial requirements

Olga A. Demidova , Olga G. Kornilova , Olga V. Muslimova ,  
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](mailto:demidova@expmed.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Plasma-derived medicinal products (PDMPs) are used to treat a number of systemic diseases, immunodeficiency disorders, and life-threatening conditions. The growing PDMP consumption necessitates the scaling of production and the provision of a stable supply of plasma, with the quality meeting international standards.

**AIM.** This study aimed to systematize and analyze national and international compendial requirements for the quality of human plasma, including that used for PDMP production, within harmonization process of national requirements with global quality standards for the development of draft pharmacopoeial monographs.

**DISCUSSION.** Analyzed regulatory documents and scientific literature revealed that plasma donation rates per donor ranged from 24 to 104 times per year in various countries, while acceptable donation volumes ranged from 650 to 850 mL. A two-stage donor selection system based on the results of two consecutive laboratory tests ensures high viral safety of medicinal products, which complies with international standards, including those of Plasma Protein Therapeutics Association. In the Russian Federation, the mandatory quarantine period for human blood plasma is 120 days. In the United States, plasma producers have voluntarily implemented a 60-day plasma quarantine protocol for further production. In France, plasma quarantine also lasts for two months. Analyzed viral safety control and assurance of individual donations, minipools, and fractionation pools (FPs) for viral markers in the national and regional quality standards revealed different approaches to standardization. The European and Indian Pharmacopoeias require testing of individual plasma donations for antibodies to HIV-1 and HIV-2, hepatitis C virus (HCV), and HBsAg. The US Code of Federal Regulations requires testing of individual plasma donations for HBsAg, antibodies to HIV-1, HIV-2, HCV, and HIV and HCV nucleic acids. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation (SP RF) requires testing of each individual plasma donation for HBsAg, antibodies to HCV, HIV-1 p24 antigen, antibodies to HIV-1 and HIV-2, and the *Treponema pallidum*. As part of harmonizing SP RF with the monographs of foreign pharmacopoeias, requirements were established for the quality of human plasma, including that used for PDMP production.

**CONCLUSIONS.** The results of a comparative analysis of national and international quality requirements for fractionated plasma and virus-inactivated human plasma indicate the need to develop modern approaches to standardization and quality control. Draft pharmacopoeial monographs Human plasma for fractionation and Human virus-inactivated plasma have been prepared.

**Keywords:** standardization; human blood plasma; donors; quarantine; individual donations; plasma pools; viral safety; general pharmacopoeial monograph; harmonization; State Pharmacopoeia of the Russian Federation; European Pharmacopoeia

**For citation:** Demidova O.A., Kornilova O.G., Muslimova O.V., Bagirova V.L. Human plasma in the production of medicinal products: national differences in terms of harmonization with global compendial requirements. *Biological Products. Prevention, Diagnostics, Treatment*. 2026;26(1):28–41. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-28-41>

**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. 056-00061-26-00 (R&D Registry No. 124022200096-0).

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные препараты (ЛП), которые получают из плазмы крови человека, например препараты иммуноглобулинов, альбумина, факторов свертывания крови, применяют для лечения пациентов с иммунодефицитными состояниями различного генеза [1, 2]; аутоиммунными, воспалительными, онкологическими, дегенеративными заболеваниями [3, 4]; с нарушениями гемостаза [5], пациентов с обширными ожогами, травмами, кровопотерей, шоком. Такие ЛП включены в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения<sup>1</sup>, производство которых зависит от обеспечения плазмой крови человека.

Существуют значительные национальные и региональные различия в объемах заготовки плазмы. По состоянию на 2022 г. большинство мощностей находились в Северной Америке, Западной Европе и Юго-Восточной Азии. Около 80% мирового рынка плазмы приходится на США [6]. Это означает зависимость других стран от импорта и обосновывает необходимость как более сбалансированного сбора плазмы на национальном уровне, так и увеличения поставок плазмы [7]. В Европейском союзе (ЕС) объем собранной плазмы крови человека не удовлетворяет потребности пациентов в ЛП из плазмы крови, поэтому страны ЕС зависят от импорта плазмы, собранной в центрах плазмафереза США. Частные центры плазмафереза Германии, Австрии, Чешской Республики и Венгрии собирают в пропорциональном

отношении в три раза больший объем плазмы, чем в любой другой стране ЕС [7]. На Латинскую Америку и Африку приходится очень небольшая доля заготовок плазмы [7]. В странах Азиатско-Тихоокеанского региона объем собираемой плазмы тоже не удовлетворяет растущий спрос на производимые из нее ЛП [8].

В Российской Федерации удовлетворение потребности населения в ЛП из плазмы крови человека является приоритетной задачей здравоохранения. Утверждена концепция<sup>2</sup> увеличения заготовки плазмы крови для производства ЛП на период до 2030 г. В документе отмечается необходимость создания инфраструктурных и технологических условий, которые позволили бы расширить ассортимент отечественных ЛП, полученных из плазмы крови человека, на российском рынке, а также обеспечения независимости фармацевтического рынка Российской Федерации и укрепления национальной безопасности<sup>3</sup>. Потребность в ЛП из плазмы крови в значительной степени удовлетворяется за счет закупок за рубежом. Так, например, подавляющее большинство ЛП, содержащих концентраты факторов свертывания крови (ФСК), закупаются за рубежом и только ЛП ФСК VIII и IX производят в России. Доля ЛП ФСК VIII российского производства на внутреннем фармацевтическом рынке составляет около 20%, ЛП ФСК IX – 20%, ЛП альбумина – 65,5%, а ЛП иммуноглобулинов человека – 49%<sup>4</sup>. Однако комплексные ЛП, например ФСК VIII в комбинации с фактором Виллебранда и ФСК II, VII, IX и X – все зарубежного производства<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> Распоряжение Правительства Российской Федерации от 09.02.2023 № 291-р «Об утверждении Концепции увеличения заготовки плазмы крови для производства лекарственных препаратов учреждениями Службы крови Федерального медико-биологического агентства России и субъектов Российской Федерации на период до 2030 года».

<sup>3</sup> Там же.

<sup>4</sup> <https://grls.rosminzdrav.ru>

<sup>5</sup> Там же.

Для снабжения рынка Российской Федерации отечественными ЛП из плазмы крови человека важна организация масштабного современного производства этих ЛП с обеспечением фармацевтических предприятий необходимым объемом плазмы крови, соответствующей международным стандартам. В соответствии с Концепцией<sup>6</sup> одним из главных направлений государственной политики в сфере увеличения заготовки плазмы крови является совершенствование нормативной правовой базы. Необходима система обеспечения качества плазмы крови человека, гарантирующая получение стандартизированного и безопасного исходного сырья в подходящих условиях его заготовки.

Заготовленная свежемороженая плазма крови человека применяется как для переливания реципиентам, так и используется в производстве ЛП при соответствии ее качества требованиям плазмы человека для фракционирования (ПДФ)<sup>7</sup>. Для переливания также применяют свежемороженую плазму, инaktivированную различными методами патогенредукции. Требования к качеству ПДФ регламентированы фармакопеей. В настоящее время в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ) включена ФС.3.3.2.0001.19<sup>8</sup>, которая нуждается в актуализации из-за различий в требованиях к качеству плазмы крови для фракционирования с международными стандартами.

Цель работы – систематизация и анализ национальных и международных фармакопейных требований к качеству плазмы крови человека, в том числе используемой для производства ЛП, в рамках гармонизации национальных требований с мировыми стандартами качества, и разработка проектов фармакопейных статей.

Поиск информации осуществлялся по базам данных eLIBRARY.RU, PubMed, ГФ РФ XIV изд., монографиям ведущих зарубежных фармакопей (Европейская, Британская, Индийская, Китайская, Японская фармакопеи и фармакопея США) и Google Scholar.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### *Контроль качества при заготовке плазмы крови*

Заготовка необходимого объема плазмы крови человека для обеспечения организаций, осуществляющих производство ЛП, гарантирует безопасность и мобилизационную готовность страны<sup>9</sup>, поскольку ЛП из плазмы крови человека широко используются в чрезвычайных ситуациях. Качество и безопасность таких ЛП зависит как от исходного сырья – плазмы, так и от последующих этапов производства ЛП.

Мировая практика характеризуется наличием государственных, некоммерческих и частных центров, осуществляющих сбор плазмы крови человека; наличием современного оборудования, технологий и подходов к заготовке плазмы крови человека; соблюдением требований надлежащей производственной практики (GMP), организацией системы заготовки, хранения и транспортировки плазмы. При этом, помимо выполнения нормативных требований Руководства Европейского директората по качеству лекарственных средств и здравоохранения (EDQM)<sup>10</sup>, заготовители используют в работе и другие стандарты. Так, для обеспечения качества и безопасности заготавливаемой плазмы разработаны добровольные стандарты безопасности, устанавливающие необходимые параметры сбора, заготовки, хранения и транспортировки плазмы крови человека, а также контроля на гемотрансмиссивные инфекции (ГТИ). К таким стандартам, обеспечивающим качество плазмы во время ее заготовки, относится Международная программа качества плазмы (International Quality Plasma Program, IQPP)<sup>11</sup> Международной Ассоциации терапии белками плазмы (Plasma Protein Therapeutics Association, PPTA). Другим стандартом, применяемым на этапе фракционирования, является программа «Стандарты качества, совершенства, гарантии и лидерства» (Quality Standards of Excellence Assurance and Leadership), которая устанавливает необходимость внутрипроизводственного тестирования на вирус гепатита

<sup>6</sup> Распоряжение Правительства Российской Федерации от 09.02.2023 № 291-р «Об утверждении Концепции увеличения заготовки плазмы крови для производства лекарственных препаратов учреждениями Службы крови Федерального медико-биологического агентства России и субъектов Российской Федерации на период до 2030 года».

<sup>7</sup> Постановление Правительства Российской Федерации от 02.02.23 № 153 «Об утверждении правил передачи организациям, осуществляющим производство лекарственных средств и (или) медицинских изделий, донорской крови и (или) ее компонентов».

<sup>8</sup> ФС.3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования. Приложение к Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд.; 2019.

<sup>9</sup> Распоряжение Правительства Российской Федерации от 09.02.2023 № 291-р «Об утверждении Концепции увеличения заготовки плазмы крови для производства лекарственных препаратов учреждениями Службы крови Федерального медико-биологического агентства России и субъектов Российской Федерации на период до 2030 года».

<sup>10</sup> Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 22th ed. Strasbourg: EDQM, Council of Europe; 2025.

<sup>11</sup> <https://www.pptaglobal.org/material/international-quality-plasma-program-iqpp>

А и парвовирус В19, использование скрининга с применением технологии амплификации нуклеиновых кислот (НК) на уровне донорства или пула, а также стандарта вирусного маркера<sup>12</sup>.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) призывает государства-члены к разработке, внедрению и поддержке координируемых в национальных масштабах программ по заготовке крови и плазмы в соответствии с наличием ресурсов для достижения самообеспеченности. В бюллетене ВОЗ<sup>13</sup> подчеркивается, что правительства стран несут ответственность за достаточную обеспеченность запасами получаемых из плазмы лекарственных средств, необходимых для лечения пациентов с различными заболеваниями. Обеспечение функционирования системы отбора доноров плазмы на национальном или региональном уровне для удовлетворения потребности в стабильном снабжении безопасным исходным сырьем для фракционирования имеет решающее значение для готовности к чрезвычайным ситуациям и поддержанию стабильности системы здравоохранения.

### Донорство

Одним из показателей качества ПДФ является содержание целевых белков, которые, как правило, представлены альбумином, ФСК, различными классами иммуноглобулинов, преимущественно класса G. К факторам, влияющим на содержание целевых белков в ПДФ, относятся индивидуальные особенности донора, частота и объем донаций плазмы, способы заготовки плазмы, ее замораживание, хранение и транспортировка. Плазму получают центрифугированием цельной крови, собранной от здоровых доноров, или методом автоматического плазмафереза. В отличие от плазмы, выделенной из цельной крови, метод плазмафереза позволяет собирать большие объемы плазмы благодаря комбинации более высокой частоты донаций и увеличения объемов за донацию [7]. Допустимая частота донации плазмы/крови в расчете на донора и допустимый объем на донацию и/или донора регулируются национальным законодательством и отличаются в разных странах (табл. 1). Большинство учреждений по сбору крови в ЕС следуют Руководству EDQM<sup>14</sup>.

Как следует из таблицы 1, частота донаций намного выше в трех странах мира: до 50 раз в год

в Австрии, до 60 раз – Германии и до 104 раз – США. Только 0,3% доноров в США сдают плазму  $\geq 100$  раз, 14% –  $\geq 50$  раз, тогда как 49% сдают  $\leq 10$  раз в год [9]. В странах Европы максимальное количество донаций составляет от 24 до 60 в год. Объем собираемой плазмы составляет от 625 до 850 мл за одну донацию. В некоторых странах объем собираемой плазмы пропорционален массе тела человека.

В США, Австрии, Чешской Республике, Германии, Венгрии и Китае плазму заготавливают от платных доноров [10]. ВОЗ и Международный комитет Красного Креста выступают за добровольное безвозмездное донорство<sup>15</sup>. «Надежные и надежные запасы крови доноров могут быть обеспечены на устойчивой основе регулярного, добровольного, безвозмездного донорства крови. Это наиболее безопасная группа доноров, так как среди них отмечается самый низкий уровень распространенности ГТИ. Резолюция Всемирной ассамблеи здравоохранения WHA63.12 от 21.05.2010 призывает все государства-члены развивать национальные системы обеспечения крови из добровольного безвозмездного донорства крови и работать над достижением цели по самообеспеченности»<sup>16</sup>.

В странах, где распространено только добровольное донорство, отмечено более высокое количество регулярных, так называемых «кадровых» доноров крови, причем это положение поддерживается на протяжении ряда лет. В тех странах, где отмечался рост добровольного донорства крови, наблюдалась тенденция к повышению процентного содержания регулярных донаций крови. Из этого следует, что добровольные доноры крови чаще сдают кровь на регулярной основе, чем семейные и/или заместительные доноры, а также платные доноры. Проблема заключается в том, что доноры могут не проходить повторное обследование, поэтому важно не только привлечь новых доноров, но и обеспечить регулярность их обследований на ГТИ. Создание такого контингента регулярных добровольных доноров крови экономически более выгодно, чем привлечение новых доноров<sup>17</sup>. По данным ВОЗ, в ряде исследований среди добровольных доноров зарегистрирована более низкая выявляемость маркеров инфекций, передающихся при переливании крови, по сравнению с другими видами донорства, причем

<sup>12</sup> Там же.

<sup>13</sup> <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>

<sup>14</sup> Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 20th ed. Strasbourg: EDQM, Council of Europe; 2020.

<sup>15</sup> <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>

<sup>16</sup> Там же.

<sup>17</sup> [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/90809/9789244599693\\_rus](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/90809/9789244599693_rus)

самые низкие уровни зарегистрированы среди регулярных доноров<sup>18</sup>.

### Отбор доноров и допуск доноров к донациям плазмы

Инфекционная безопасность — основной критерий качества ПДФ. Система обеспечения вирусной безопасности на предприятиях РРТА включает: строгий и тщательный отбор доноров; серологический скрининг индивидуальных донаций; обязательное сочетание

иммунологических и молекулярно-генетических методов испытания на маркеры ГТИ; карантинное хранение плазмы в течение определенного промежутка времени, после которого доноры повторно обследуются; испытание индивидуальных донаций, минипулов и производственного пула на маркеры ГТИ; обязательное включение в производственный процесс не менее 2 стадий инактивации и/или элиминации вирусов<sup>19</sup>. Каждый этап вносит свой вклад в снижение вирусной нагрузки ЛП.

Таблица 1. Частота и объем донации плазмы крови на одного донора

Table 1. Plasma donation frequency and volume per donor

Страны <i>Countries</i>	Разрешенная частота донаций на одного донора <i>Permitted donation frequency per donor</i>	Разрешенный объем донаций на одного донора <i>Permitted donation volume per donor</i>	Источник <i>Reference</i>
Нидерланды <i>Netherlands</i>	Максимум 26 раз в год с интервалом $\geq 14$ сут между донациями <i>A maximum of 26 times per year within interval of <math>\geq 14</math> days between donations</i>	$\leq 650$ мл <i><math>\leq 650</math> mL</i>	Сноска <sup>a</sup> <i>Footnote<sup>a</sup></i>
Австрия <i>Austria</i>	50 раз в год, или 3 раза в 2 нед., или 2 раза в 7 сут, или 1 раз в 72 ч <i>50 times a year or 3 times every 2 weeks or 2 times every 7 days or once every 72 h</i>	$\leq 700$ мл <i><math>\leq 700</math> mL</i>	Сноска <sup>a</sup> <i>Footnote<sup>a</sup></i>
Чешская Республика <i>Czech Republic</i>	Максимум 25 л (24 раза) в год с интервалом $\geq 14$ сут между донациями <i>A maximum of 25 L (24 times) per year within interval of <math>\geq 14</math> days between donations</i>	$\leq 650$ мл, но не более 1,5 л/нед. <i><math>\leq 650</math> mL, but no more than 1.5 L per week</i>	Сноска <sup>b</sup> <i>Footnote<sup>b</sup></i>
Германия <i>Germany</i>	Максимум 60 раз в год с интервалом $\geq 2$ сут между донациями <i>A maximum of 60 times per year within interval of <math>\geq 2</math> days between donations</i>	Вес донора $\leq 60$ кг: $\leq 650$ мл <i>Donor weight <math>\leq 60</math> kg: <math>\leq 650</math> mL</i> Вес донора $> 60$ кг и $\leq 80$ кг: $\leq 750$ мл <i>Donor weight <math>&gt; 60</math> kg and <math>\leq 80</math> kg: <math>\leq 750</math> mL</i> Вес донора $> 80$ кг: $\leq 850$ мл <i>Donor weight <math>&gt; 80</math> kg: <math>\leq 850</math> mL</i>	Сноска <sup>c</sup> <i>Footnote<sup>c</sup></i>
Венгрия <i>Hungary</i>	Максимум 45 раз в год <i>A maximum of 45 times per year</i> 1 донация в 72 ч <i>One donation every 72 hours</i>	$\leq 850$ мл <i><math>\leq 850</math> mL</i>	Сноска <sup>d</sup> <i>Footnote<sup>d</sup></i>
США <i>USA</i>	Максимум 104 раза в год <i>A maximum of 104 times per year</i> Не более 2 раз в 7 сут с интервалом в 2 сут <i>Not more than twice every 7 days with a 2-day interval</i>	Вес донора 50–67 кг: $\leq 625$ мл <i>Donor weight 50–68 kg: <math>\leq 625</math> mL</i> Вес донора 68–79 кг: $\leq 750$ мл <i>Donor weight 68–79 kg: <math>\leq 750</math> mL</i> Вес донора $> 79$ кг: $\leq 800$ мл <i>Donor weight <math>&gt; 79</math> kg: <math>\leq 800</math> mL</i>	Сноска <sup>e</sup> <i>Footnote<sup>e</sup></i>
Франция <i>France</i>	Максимум 24 раза в год с интервалом $\geq 14$ сут <i>A maximum of 24 times per year within interval of <math>\geq 14</math> days</i>	$\leq 750$ мл <i><math>\leq 750</math> mL</i>	Сноска <sup>f</sup> <i>Footnote<sup>f</sup></i>
Япония <i>Japan</i>	Максимум 24 раза в год с интервалом $\geq 14$ сут <i>A maximum of 24 times per year within interval of <math>\geq 14</math> days</i>	$\leq 600$ мл <i><math>\leq 600</math> mL</i>	Сноска <sup>g</sup> <i>Footnote<sup>g</sup></i>
Россия <i>Russia</i>	Максимум 16 л (24 раза) в год с интервалом $\geq 14$ сут <i>A maximum of 16 L (24 times) per year within interval of <math>\geq 14</math> days between donations</i>	10 мл/кг массы тела, но не более 750 мл (без учета консервантов) <i>10 mL/kg of body weight, but not more than 750 mL (excluding preservatives)</i>	Сноска <sup>h</sup> <i>Footnote<sup>h</sup></i>

Таблица составлена авторами / The table was prepared by the authors

<sup>a</sup> <https://www.europlasma.at/en/donate-plasma/information-for-donors>

<sup>b</sup> <https://www.plasmaplace.cz>

<sup>c</sup> <https://www.drk-blutspende.de/informationen-zur-blutspende/die-plasmaspende.php>

<sup>d</sup> Согласно данным [10] / According to [10].

<sup>e</sup> Kluszczynski T, Rohr S, Ernst R. Key economic and value considerations for Plasma-Derived Medicinal Products (PDMPs) in Europe. White paper. Vaarn, Netherlands: Vintura; 2020.

<sup>f</sup> <https://dondesang.efs.sante.fr/le-don-de-plasma>

<sup>g</sup> Japanese Red Cross Society; 2023.

<sup>h</sup> Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28.10.2020 № 1166н. / Order of Ministry of Health of the Russian Federation No. 1166n of 10/28/2020.

<sup>18</sup> Там же.

<sup>19</sup> <http://www.pptaglobal.org>

Международный опыт по обеспечению инфекционной безопасности ПДФ обобщен в Рекомендациях по производству, контролю плазмы и регулированию плазмы человека для фракционирования<sup>20</sup> ВОЗ. Изложенная в документе стратегия обеспечения качества и безопасности плазмы направлена на максимальное снижение вероятности попадания в производственный пул инфицированной плазмы и включает следующий комплекс мер: отбор здоровых доноров плазмы, тестирование плазмы доноров на наличие маркеров ГТИ, эпидемиологическое наблюдение за популяцией доноров, соблюдение требований GMP. Правильный отбор доноров ПДФ является одним из ключевых факторов, обеспечивающих безопасность получаемых из плазмы ЛП, и позволяет снизить остаточный риск контаминации для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатитов В и С  $\geq 100$  раз<sup>21</sup>. Таким образом, хорошо охарактеризованная база доноров и разработанные процедуры отбора доноров из групп населения с низким риском заражения патогенами имеют важное значение для обеспечения инфекционной безопасности ПДФ.

**Отбор доноров.** Обеспечение качества плазмы на этапе ее заготовки в первую очередь связано с отбором доноров, прошедших тщательный медицинский скрининг. В Российской Федерации отбор доноров осуществляется в соответствии с требованиями действующих нормативных правовых документов. Законодательная поддержка донорства на государственном уровне осуществляется на основании Федерального закона 125-ФЗ<sup>22</sup>. Приказом Минздрава России<sup>23</sup> утвержден порядок медицинского осмотра доноров, перечень противопоказаний и сроки отвода, допуск к донации; указаны нормы состава крови, объемы забора крови, интервалы между процедурами и др.

Национальные регуляторные органы играют главную роль в разработке гармонизированной системы критериев отбора доноров, учитывающей соответствующие инфекционные риски и эпидемиологическую ситуацию в стране, в которой заготавливают плазму<sup>24</sup>. Анализ опыта зарубежных заготовителей плазмы показал, что ПДФ собирают через двухэтапную систему допуска доноров к донациям ПДФ, включающую «квалифицированных» доноров. Квалифицированный донор должен

дважды успешно пройти медицинское обследование и подтвердить отсутствие маркеров ГТИ<sup>25</sup>. Интервал между обследованиями составляет  $\geq 2$  нед., но не должен превышать 6 мес. Если доноры не имеют донаций на протяжении  $> 6$  мес., они лишаются статуса квалифицированных и должны снова пройти процедуру подтверждения статуса по результатам двукратного обследования. Следовательно, заготовку ПДФ не проводят при первом обращении донора и в случае утраты им статуса квалифицированного донора. Такую систему заготовки от квалифицированных доноров, регулярно обследуемых на ГТИ, применяют многие зарубежные заготовители плазмы. Для организаций, участвующих в программе IQPP, реализуемой РРТА, внедрение данной системы является обязательным [11]. Стандарт РРТА позволяет определить предельно допустимую частоту встречаемости (тревожный уровень) подтвержденных случаев выявления маркеров ГТИ (суммарную и по каждому возбудителю отдельно) у регулярных доноров ПДФ в зависимости от возможности заготовителя плазмы [12]. В Российской Федерации двухэтапная система допуска доноров к донациям ПДФ не является обязательной.

В ФГБУ «Российский медицинский научно-производственный центр «Росплазма» Федерального медико-биологического агентства» была разработана и внедрена собственная система утверждения доноров ПДФ на основе международного стандарта РРТА, которая предусматривает допуск потенциального донора к донации ПДФ только по результатам двух клинико-лабораторных обследований, включая определение маркеров ГТИ. Разработчики рекомендовали внедрение системы утверждения доноров в других учреждениях, осуществляющих массовую заготовку ПДФ [11].

Парамонов И.В. с соавт. установили, что в условиях массовой заготовки ПДФ двухэтапная система отбора доноров обеспечивает формирование пула регулярных доноров с низким риском выявления маркеров ГТИ. Суммарная частота обнаружения маркеров вируса гепатита В, вируса гепатита С и вируса иммунодефицита человека первого и второго типов (ВИЧ-1, ВИЧ-2) составляет от 0,05 до 0,07%<sup>26</sup>. Внедренная на региональном уровне система обеспечивает

<sup>20</sup> Recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation. TRS No 930. WHO; 2007.

<sup>21</sup> Там же.

<sup>22</sup> Федеральный закон Российской Федерации от 20.07.2012 № 125-ФЗ «О донорстве крови и ее компонентов».

<sup>23</sup> Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28.10.2020 № 1166н.

<sup>24</sup> Там же.

<sup>25</sup> <http://www.pptaglobal.org>

<sup>26</sup> Парамонов ИВ. Система обеспечения качества и инфекционной безопасности плазмы для фракционирования в условиях ее массовой заготовки: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб.; 2017.

уровень инфекционной безопасности плазмы, соответствующий требованиям РРТА.

### **Карантинизация плазмы**

Полученная плазма крови человека после донации замораживается и помещается в карантинную зону. Карантинизация свежемороженой плазмы – важный этап обеспечения ее вирусной безопасности. В соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации<sup>27</sup> карантинизацию плазмы определяют как хранение плазмы с запретом ее использования до повторного исследования образца крови донора на ГТИ. Карантинизация может быть активной – с обязательным повторным обследованием донора или пассивной, когда ожидают сигнал о выявлении инфекции у донора [13]. Каждая индивидуальная донация плазмы хранится в карантине до получения результатов лабораторных исследований.

При положительных результатах исследований на ГТИ индивидуальную донацию плазмы использовать нельзя. Если результаты исследований удовлетворительные, то далее индивидуальные донации плазмы подвергают карантинизации в течение определенного промежутка времени в соответствии с действующими национальными стандартами до повторного испытания на маркеры ГТИ. Это связано с тем, что серонегативное окно или скрытый период вирусносительства невозможно определить даже с помощью современных методов лабораторного исследования. Если организации, осуществляющие производство ЛП из ПДФ, имеют в технологическом процессе производства не менее двух ортогональных стадий инактивации и/или элиминации вирусов, то допускается передача им плазмы, которая не прошла карантинизацию или которая находится на карантинном хранении<sup>28</sup>.

### **Международная практика карантинизации плазмы**

Подходы к карантинизации плазмы различаются в разных регионах мира и странах. Точные и своевременные результаты испытаний на маркеры ГТИ важны для предотвращения

инфицирования реципиентов крови и ее компонентов. Выбор подходящих лицензированных и валидированных тестов для скрининга должен соответствовать действующим национальным стандартам. Алгоритмы тестирования должны быть разработаны с учетом эпидемиологической ситуации в популяции доноров, в которой заготавливают плазму, поскольку это влияет на вероятность получения точного результата до начала теста и его эффективность<sup>29</sup>.

**В Российской Федерации** до 2019 г. срок карантинизации плазмы составлял 180 сут. Однако внедрение современных высокочувствительных молекулярно-генетических методов выявления НК вирусов при использовании технологии амплификации НК (nucleic acid amplification technologies, NAT) и эффективных методов патогенредукции плазмы позволило пересмотреть сроки карантинизации. В настоящее время установленный срок карантинизации плазмы составляет 120 сут<sup>30</sup>. Во время первой донации (период серонегативного окна), если донор уже мог быть инфицирован и вирус активно размножался в организме, но титр специфических антител к антигенам ГТИ в момент донации находится ниже предела обнаружения методики, то через 120 сут антитела будут выявлены с гораздо большей вероятностью. По окончании срока карантинизации донор, сдавший данную порцию плазмы, должен вновь пройти медицинское обследование для подтверждения отсутствия инфицирования гепатитом В, гепатитом С, ВИЧ и сифилисом. В случае неявки донора на повторное обследование, а также при выявлении у донора маркеров ГТИ в период карантинизации или на момент истечения ее срока, все индивидуальные донации плазмы крови, заготовленные от этого донора, уничтожаются<sup>31</sup>. В соответствии с требованиями ФС.3.3.2.0001.19<sup>32</sup> предусмотрена процедура карантинизации согласно с действующими нормативными правовыми документами, регламентирующими заготовку, хранение, транспортировку плазмы крови.

**ЕАЭС.** В Решении Совета Евразийской экономической комиссии<sup>33</sup> в разделе «Процедура

<sup>27</sup> Постановление Правительства Российской Федерации от 14.05.2025 № 641 «Об утверждении правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов».

<sup>28</sup> Постановление Правительства Российской Федерации от 02.02.2023 № 153.

<sup>29</sup> Руководство по приготовлению, использованию и контролю качества компонентов крови, 21th ed. Strasbourg: EDQM, Council of Europe; 2023.

<sup>30</sup> Постановление Правительства Российской Федерации от 14.05.2025 № 641.

<sup>31</sup> Там же.

<sup>32</sup> ФС.3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования. Приложение к Государственной фармакопее Российской Федерации. XIV изд.; 2019.

<sup>33</sup> Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (ред. от 15.07.2022).

карантинного хранения» отмечается, что в основном досье плазмы крови должна быть подробно описана действующая процедура карантинного хранения или хранения запасов плазмы с обоснованием выбранного срока хранения плазмы.

**США.** Согласно монографии «Плазма крови человека»<sup>34</sup> Фармакопеи США «каждая отдельная единица плазмы, предназначенная для переливания или дальнейшего производства, хранится на карантине до тех пор, пока не будут завершены все необходимые испытания. Производители плазмы добровольно внедрили протокол хранения плазмы (карантинизацию) до производства в течение 60 дней». Основанием для карантинного хранения является тот факт, что доноры, которые недавно были инфицированы патогеном, возможно, не выработали уровень антител на момент донорства, тем самым сдавая инфицированную кровь, несмотря на отрицательные результаты испытаний на маркеры ГТИ. Карантинное хранение дает достаточно времени для того, чтобы у инфицированного донора выработался уровень антител, который будет обнаружен во время последующего донорства. Карантинное хранение в течение 60 сут также снижает вероятность попадания инфекционного материала в производственный процесс.

Согласно Руководству FDA<sup>35</sup> исходная плазма, полученная от платных доноров и признанная пригодной для дальнейшего производства ЛП, должна находиться на карантине не менее 60 календарных дней, прежде чем будет разрешена к дальнейшему использованию в производстве. Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA, США) не намерено предпринимать никаких регулирующих действий относительно срока хранения, если исходная плазма будет выпущена после карантина продолжительностью 45 календарных дней вместо 60, при условии соблюдения всех остальных требований к пригодности донора и донации.

**Страны Европы.** Карантинизация плазмы во Франции осуществляется согласно стандартам, указанным в Руководстве FDA<sup>36</sup>. Сроки карантинизации сокращены в 2011 г. с 3 до 2 мес. [14]. В Германии в 1993 г. был введен карантинный срок хранения плазмы для переливания продолжительностью 6 мес., который в 2003 г. был

сокращен до 4 мес. в связи с усовершенствованием методов скрининга, используемых в учреждениях по переливанию крови [15].

#### **Патогенредукция плазмы крови**

Большие объемы заготовленной плазмы уничтожаются вследствие неявки доноров на повторное обследование. Для снижения потерь плазмы применяют различные методы патогенредукции. Плазма патогенредуцированная – это свежемороженая плазма, инактивированная подходящим методом. Применяют фотодинамический метод с обработкой метиленовым синим, однако некоторые реципиенты имеют индивидуальную непереносимость метиленового синего, что является ограничением метода [14]. Другой метод патогенредукции плазмы заключается в использовании растворителей-детергентов. Так, в Нидерландах в 2014 г. карантинизированная плазма была заменена на плазму, инактивированную сольвент-детергентным методом [16]. Широко применяют ультрафиолетовое облучение плазмы с добавлением рибофлавина или амотосалена [17].

Обнаружение вирусов методами на основе NAT не зависит от титра антител. Тем не менее методы NAT не могут обеспечить обнаружение всего спектра вирусов и характеризуются определенными, хотя и очень низкими, пределами обнаружения, поэтому карантинизация плазмы по-прежнему актуальна и продолжает применяться.

#### **Практика определения маркеров гемотрансмиссивных инфекций в донациях плазмы крови**

Испытание индивидуальных донаций плазмы является обязательным условием минимизации риска вирусной контаминации. Согласно рекомендациям ВОЗ для каждой индивидуальной донации крови (плазмы) проводят исследование маркеров вирусных инфекций: антител к ВИЧ; поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg); антител к вирусу гепатита С; возбудителю сифилиса<sup>37</sup>. В Рекомендациях ВОЗ<sup>38</sup> обязательными являются испытания на ВИЧ-1, ВИЧ-2, HBsAg и антитела к вирусу гепатита С, а также испытания индивидуальных донаций или минипулов методом на основе NAT на наличие НК вирусов иммунодефицита человека, вирусов гепатитов В и С. В Европе методы на основе NAT

<sup>34</sup> 1180 Human plasma. United States Pharmacopeia. 2025.

<sup>35</sup> Compliance policy regarding blood and blood component donation suitability, donor eligibility and source plasma quarantine hold requirements. Guidance for industry. FDA; 2023.

<sup>36</sup> Там же.

<sup>37</sup> <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>

<sup>38</sup> WHO recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation. Annex. 4, TRS No 941. WHO; 2005.

используют для тестирования как индивидуальных донаций, так и нескольких донаций, объединенных в минипулы. Испытания на антитела к возбудителю сифилиса не предусмотрены в указанных Рекомендациях ВОЗ<sup>39</sup>.

Г. Кауг с соавт. отмечали, что с 1966 г. в мире не было зарегистрировано ни одного случая передачи сифилиса вследствие переливания крови и/или плазмы [18]. Для предупреждения риска инфицирования сифилисом вследствие гемотрансфузии достаточны следующие меры: анкетирование кандидатов в доноры, включающее специально разработанные вопросы (выявление лиц с потенциальным риском инфицирования сифилисом; самоотвод доноров крови, больных сифилисом со спирохетемией; отвод потенциальных доноров, у которых выявлено поведение высокого риска заражения сифилисом); обязательное индивидуальное серологическое исследование образцов крови донора, чтобы подтвердить ее безопасность для принятия решения о ее пригодности или непригодности для дальнейшего использования при положительном результате исследования. Существует также предположение, что низкий риск инфицирования сифилисом вследствие переливания плазмы связан с гибелью, а также с потерей или резким снижением вирулентности *Treponema pallidum* при хранении плазмы в течение нескольких часов при комнатной температуре, в холодильнике и при замораживании. Однако по результатам метаанализа 10 исследований, проведенных с использованием кроликов (8), крыс (1), а также с привлечением людей (1), Т. D'aes с соавт. [19] заключили, что пока не ясно, устраняет ли длительное хранение риск сифилиса, передающегося через кровь. Несмотря на то что инфекционность крови, содержащей *T. pallidum*, может снижаться после 72 ч хранения в холодильнике, вероятность передачи сифилиса при переливании крови может сохраняться в течение нескольких суток. Отсутствие достаточно обоснованных исследований, в том числе на людях, подчеркивает необходимость дальнейшего изучения влияния температуры хранения на вирулентность *T. pallidum* [19].

Национальные регуляторные органы могут потребовать проведения дополнительных испытаний на наличие других маркеров с учетом эпидемиологической ситуации в конкретном

регионе или стране. Так, в докладе ВОЗ 14 стран, включая Австрию, Канаду, Кипр, Германию, Грецию, Великобританию и США, сообщили о политике тестирования на вирус Западного Нила. Канада и США проводили тестирование всех донаций крови на наличие РНК вируса Западного Нила, в то время как в других странах тестирование проводили выборочно. США сообщили также о политике тестирования на вирус Зика, а четыре страны – Финляндия, Япония, Люксембург и Швейцария – сообщили о политике тестирования всех донаций крови на наличие парвовируса человека В19. Швейцария указала, что данная политика проводится в соответствии с требованиями индустрии фракционирования. Люксембург и Швейцария сообщили также о политике тестирования на вирус гепатита А. Франция, Япония и Люксембург сообщили о политике выборочного тестирования на вирус гепатита Е<sup>40</sup>.

В Российской Федерации индивидуальные донации плазмы контролируют на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антигена р24 ВИЧ-1, HBsAg, антител к вирусу гепатита С и к возбудителю сифилиса<sup>41</sup>. После объединения в минипулы образцов плазмы, показавших отрицательные результаты, их подвергают испытаниям методами на основе NAT на наличие НК вируса ВИЧ, вируса гепатита В и С<sup>42</sup>. Определение ДНК парвовируса В19 и РНК вируса гепатита А в Российской Федерации не является обязательным.

Таким образом, роль скрининговых испытаний заключается в снижении до минимального уровня патогенной нагрузки в производственном пуле. Международные практики, направленные на обеспечение качества и безопасность плазмы, различаются в зависимости от национальных законодательных актов. Эти отличия проявляются, в частности, в различных алгоритмах сбора плазмы, которые предполагают как платное, так и безвозмездное донорство, в различных частотах и объемах донаций, распространенности частных и/или государственных центров сбора, а также возможности фракционирования плазмы.

### Сравнительный анализ фармакопейных требований к плазме человека

В зарубежных фармакопеях требования к качеству плазмы крови человека изложены

<sup>39</sup> Там же.

<sup>40</sup> Глобальный доклад по текущей ситуации в отношении безопасности донорской крови и ее наличия. ВОЗ; 2021. <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/f83ea916-d056-4f2a-a6c6-597fa27123b0/content>

<sup>41</sup> ФС.3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования. Приложение к Государственной фармакопее Российской Федерации. XIV изд.; 2019.

<sup>42</sup> Там же.

в соответствующих монографиях. В Европейской фармакопее (Ph. Eur.) это требования к ПДФ<sup>43</sup> и вирусиноактивированной плазме<sup>44</sup>. В фармакопее США (USP) требования к плазме приведены в монографии<sup>45</sup>, а также требования к заготовке и обработке плазмы установлены FDA (США) и подробно изложены в Своде законов США<sup>46</sup> (Code of Federal Regulations (21 CFR)). В Индийскую фармакопею (IP) включены две монографии – на плазму для фракционирования<sup>47</sup> и плазму вирусиноактивированную<sup>48</sup>, также две монографии<sup>49</sup> включены и в Британскую фармакопею (BP). Монографии BP гармонизированы с монографиями Ph. Eur. Индивидуальные монографии с требованиями к плазме крови человека отсутствуют в Японской фармакопее (JP), однако в JP приведены требования к ее вирусной безопасности согласно Руководству по обеспечению вирусной безопасности препаратов белковых фракций плазмы крови<sup>50</sup>. В Китайскую фармакопею (ChP) включена одна монография<sup>51</sup> на ПДФ. ФС.3.3.2.0001.19<sup>52</sup> ГФ РФ XIV изд. содержит требования к качеству субстанции, предназначенной для производства ЛП.

Важным критерием качества ПДФ является ее безопасность. Анализ контроля и обеспечения вирусной безопасности индивидуальных донаций, минипулов и производственных пулов ПДФ в национальных и региональных стандартах качества выявил различия (табл. S1, опубликована на сайте журнала<sup>53</sup>). Как указано выше, в Европе существуют отдельные стандарты качества на плазму вирусиноактивированную, для получения которой используют технологический процесс, и плазму для фракционирования.

В Ph. Eur. и IP индивидуальные донации плазмы обязательно испытывают с целью выявления следующих маркеров: антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, HBsAg и антител к вирусу гепатита С. В ГФ РФ предусмотрено проведение испытаний каждой индивидуальной донации плазмы на наличие HBsAg, антител к вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ-1, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и к возбудителю сифилиса. В ходе анализа

монографий выявлено, что в USP в одном стандарте качества приведены требования к вирусиноактивированной плазме, предназначенной для прямого переливания пациентам и полученной из цельной крови, и к плазме, используемой для дальнейшего производства ЛП. В США регулирование качества плазмы осуществляется также в соответствии со Сводом законов США<sup>54</sup>. Свод законов США устанавливает испытания индивидуальных донаций плазмы на содержание HBsAg, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антител к вирусу гепатита С и на наличие НК ВИЧ и вируса гепатита С.

В отличие от Ph. Eur. в монографии ChP предусмотрен контроль индивидуальных донаций плазмы на наличие возбудителя сифилиса, а при амплификации НК для выявления РНК вируса гепатита В и РНК вируса гепатита С не предусмотрено применение соответствующего стандартного образца. В ChP определение содержания общего белка проводят только биуретовым методом; также предусмотрено определение содержания аланинаминотрансферазы (АЛТ) в индивидуальных донациях, которое отсутствует в других мировых стандартах. Однако национальные регуляторные органы могут принять решение о необходимости проведения дополнительного испытания на содержание АЛТ. В Ph. Eur. предусмотрен метод определения общего белка с помощью минерализации серной кислотой с последующим расчетом количественного содержания белка по массовой доле азота (метод Кьельдаля). Также предусмотрено определение активности ФСК человека VIII, которое проводят в плазме, предназначенной для получения концентратов лабильных белков.

В соответствии с Ph. Eur. производственные пулы ПДФ контролируют на наличие HBsAg, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и на наличие РНК вируса гепатита С. В отличие от Ph. Eur. в USP отсутствуют серологические испытания пулов плазмы, серологическое тестирование проводят на индивидуальных донациях, а минипулы

<sup>43</sup> 0853 Human plasma for fractionation. European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025.

<sup>44</sup> 1646 Human plasma (pooled and treated for virus inactivation). European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025.

<sup>45</sup> 1180 Human plasma. United States Pharmacopoeia. 2025.

<sup>46</sup> <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-F>

<sup>47</sup> Plasma for fractionation. Indian Pharmacopoeia. 9.0. 2022.

<sup>48</sup> Plasma (Pooled and treated for virus inactivation). Indian Pharmacopoeia. 9.0. 2022.

<sup>49</sup> Plasma for fractionation. British Pharmacopoeia. 10.5. 2022. Plasma (Pooled and treated for virus inactivation). British Pharmacopoeia. 10.5. 2022.

<sup>50</sup> G3-13-141 Basic requirements for viral safety of biotechnological/biological products listed. Japanese Pharmacopoeia. 18th ed. 2022.

<sup>51</sup> Human source plasma for blood products. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2020.

<sup>52</sup> ФС.3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования. Приложение к Государственной фармакопее Российской Федерации. XIV изд.; 2019.

<sup>53</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-28-41-table-s1>

<sup>54</sup> <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-F>

и производственные пулы тестируют методами на основе NAT. Согласно ГФ РФ производственный пул плазмы обязательно контролируют иммунологическими методами (определение антигена р24 ВИЧ-1, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антител к вирусу гепатита С, HBsAg, возбудителя сифилиса) и методами на основе NAT (определение НК ВИЧ, вируса гепатита В и С). В соответствии с монографией ChP в производственном пуле предусмотрены испытания на наличие HBsAg, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и НК ВИЧ, вируса гепатита В и С, а также определение содержания антител к HBsAg. В монографии IP производственные пулы ПДФ контролируют на наличие HBsAg, антител к ВИЧ, вирусу гепатита С и на наличие НК вируса гепатита С.

Условия замораживания и хранения плазмы влияют на сохранность белков и, следовательно, на выход целевых продуктов. Требования к условиям замораживания и хранения ПДФ в Ph. Eur. и USP различны. В монографии USP указано, что ПДФ должна быть заморожена до температуры минус 20 °С. В Ph. Eur. требования к температуре заморозки плазмы приведены в зависимости от вида фракционируемых белков: лабильные белки – ФСК; стабильные белки – альбумин и иммуноглобулины. В ГФ РФ требования к температурному режиму гармонизированы с Ph. Eur. По мнению A. Farrugia с соавт., требования, содержащиеся в Ph. Eur., больше отражают вопросы выхода продукта, чем вопросы безопасности, поэтому они не должны быть отражены в стандартах качества. Для этой цели достаточно хранения ПДФ при температуре не выше минус 20 °С, как изложено в монографии USP [20]. Качество ЛП, которые получают из ПДФ, зависит как от особенностей технологии производства, так и от стандартизации и качества ПДФ. Таким образом, анализ международных фармакопейных требований позволил установить необходимость формирования современных подходов к отечественной фармакопейной стандартизации плазмы крови.

### Совершенствование национальных фармакопейных стандартов качества на плазму крови человека

#### Проект фармакопейной статьи (ФС) «Плазма человека для фракционирования»

Внесение изменений в подготовленный проект ФС «Плазма человека для фракционирования»

обусловлено необходимостью усовершенствования стандартизации ПДФ, гарантирующего качество и вирусную безопасность.

**Структура проекта ФС** гармонизирована с аналогичной монографией Ph. Eur.<sup>55</sup> с учетом требований действующих национальных нормативных правовых документов, а также требований к донорству. Кроме того, учтен уровень развития отечественного промышленного фармацевтического производства ЛП из плазмы крови человека. Проект ФС содержит следующие разделы: требования к донорам и индивидуальным донациям плазмы (индивидуальным единицам плазмы); требования к температурным режимам замораживания плазмы, предназначенной для выделения лабильных или стабильных белков; предусмотрена обязательная карантинизация; предусмотрено определение активности ФСК человека VIII и определение содержания общего белка; предусмотрены требования к объединенной плазме; указаны особенности температурных режимов хранения и транспортировки плазмы; предусмотрены разделы «Описание» и «Информация о маркировке».

**Гемотрансмиссивные инфекции.** Используемое исходное сырье имеет человеческое происхождение, которое может быть контаминировано возбудителями ГТИ. Система обеспечения вирусной безопасности плазмы крови человека организована на этапах производства, что необходимо для снижения вирусной нагрузки готового ЛП, поэтому требования к маркерам ГТИ предусмотрены в разделе «Производство». В отличие от ФС.3.3.2.0001.19<sup>56</sup>, в проекте ФС на ПДФ исключен раздел «Испытания». Передача ПДФ в производство включает испытание индивидуальных донаций, минипулов и производственного пула на наличие маркеров вирусных инфекций. В проекте ФС предусмотрено проведение испытаний на наличие вирусных маркеров ГТИ индивидуальных донаций плазмы, минипулов, если индивидуальные донации были в них объединены (при необходимости), и производственного пула. В проекте ФС на ПДФ, в отличие от действующей ФС.3.3.2.0001.19<sup>57</sup>, не предусмотрено проведение испытания индивидуальных донаций плазмы и пулов плазмы на отсутствие возбудителя сифилиса, что гармонизировано с ведущими фармакопеями мира.

**Карантинизация плазмы.** Несмотря на то что в Ph. Eur. и ChP информация о карантинизации отсутствует, а в USP указывается о добровольном

<sup>55</sup> 0853 Human plasma for fractionation. European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025.

<sup>56</sup> ФС.3.3.2.0001.19 Плазма человека для фракционирования. Приложение к Государственной фармакопее Российской Федерации. XIV изд.; 2019.

<sup>57</sup> Там же.

внедрении производителями протокола хранения плазмы, в проекте ФС «Плазма человека для фракционирования» сохранено указание о необходимости карантинного хранения плазмы. Это согласуется с национальным законодательством Российской Федерации, в соответствии с которым процедура карантинизации плазмы является обязательной<sup>58</sup>.

### Проект фармакопейной статьи (ФС) «Плазма человека вирусинактивированная»

В Ph. Eur., BP и IP включены отдельные стандарты качества на плазму вирусинактивированную, а в ГФ РФ аналогичная ФС отсутствует. В проекте ФС «Плазма человека вирусинактивированная» предусмотрено, что исходное сырье, используемое для получения плазмы человека вирусинактивированной, должно соответствовать требованиям (где применимо) ФС «Плазма человека для фракционирования».

**Структура проекта ФС.** Структура проекта ФС гармонизирована с аналогичной монографией Ph. Eur.<sup>59</sup>. В разделе «Производство» способ производства должен включать этапы, на которых инактивируются известные инфекционные патогены. В методе инактивации оболочечных вирусов растворителем-детергентом предусмотрено использование подходящих вирусинактивирующих агентов, например комбинации трибутилфосфата и октоксинола 10. В разделе «Испытания», помимо определения pH, осмоляльности и общего белка, предусмотрено определение активированных факторов свертывания крови, анти-A и анти-B гемагглютининов, антител к вирусу гепатита А, нерегулярных эритроцитарных антител, активированного частичного тромбопластинового времени.

**Гемотрансмиссивные инфекции.** Испытания пула плазмы в подготовленном проекте ФС

гармонизированы с Ph. Eur., их проводят иммунологическими методами на наличие HBsAg и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, а также методами амплификации НК на наличие РНК вируса гепатита А, РНК вируса гепатита С и Е и ДНК парвовируса В19. В отличие от Ph. Eur. в IP не предусмотрено испытания пула плазмы на наличие РНК вируса гепатита Е.

Таким образом, подготовленные проекты ФС «Плазма человека для фракционирования» и «Плазма человека вирусинактивированная» гармонизированы с мировыми стандартами качества и отражают современный уровень фармакопейной стандартизации. Указанные проекты утверждены на заседании Совета Министерства здравоохранения Российской Федерации по Государственной фармакопее и будут включены в приложение к XV изд. ГФ РФ.

## Выводы

1. Результаты сравнительного анализа национальных и международных требований к качеству плазмы крови человека указали на необходимость создания современных подходов к стандартизации и контролю качества как ПДФ, так и плазмы вирусинактивированной российского производства.
2. В рамках гармонизации ГФ РФ с мировыми стандартами качества установлены требования к качеству плазмы крови человека, в том числе используемой для производства ЛП, с учетом национальных подходов.
3. На основе проведенного анализа национальных и международных требований к качеству плазмы крови человека, в том числе используемой для производства ЛП, подготовлены проекты ФС для ГФ РФ XV изд., отражающие современный уровень фармакопейной стандартизации.

## 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(S4):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 suppl):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. Nathwani AC. Gene therapy for hemophilia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2022(1):569–88. <https://doi.org/10.1182/hematology.2022000388>
6. Махмудова МР. Международный опыт заготовки плазмы крови для фракционирования. *Журнал теоретической и клинической медицины.* 2022;(5):109–12. Makhmudova MR. International experience in the preparation of blood plasma

<sup>58</sup> Постановление Правительства Российской Федерации от 14.05.2025 № 641.

<sup>59</sup> 1646 Human plasma (pooled and treated for virus inactivation). European Pharmacopoeia. 11.8. Strasbourg: EDQM; 2025.

- for fractionation. *Journal of Theoretical and Clinical Medicine*. 2022;(5):109–12 (In Russ.). EDN: [QYAZRN](https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000696)
- Prevot J, Jolles S. Global immunoglobulin in supply: Steaming towards the iceberg? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2020;20(6):557–64. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000696>
  - Bhatnagar S, Burnouf T, Prevot J, et al. Navigating the Asia-Pacific region plasma therapies landscape: Insights from the 2023 Asia-Pacific Plasma Leaders' Network meetings. *Vox Sang*. 2024;119(11):1207–13. <https://doi.org/10.1111/vox.13725>
  - Schreiber GB, Kimber MC. Source plasma donors: A Snapshot. *Transfusion*. 2017;57(Supplement S3):110A. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.32748.87683>
  - Strengers PFW. Challenges for plasma-derived medicinal products. *Transfus Med Hemother*. 2023;50(2):116–22. <https://doi.org/10.1159/000528959>
  - Парамонов ИВ, Попцов АЛ, Рылов АВ. Опыт внедрения системы утверждения доноров плазмы для фракционирования. *Гематология и трансфузиология*. 2016;61(2):87–91. Paramonov IV, Popstov AL, Rylov AV. Experience of implementing a system of qualification plasma for fractionation donors. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2016;61(2):87–91 (In Russ.). EDN: [VZVYCB](https://doi.org/10.1159/000528959)
  - Парамонов ИВ. Оценка эффективности системы обеспечения качества и инфекционной безопасности плазмы для фракционирования. *Вятский медицинский вестник*. 2016;(4):76–84. Paramonov IV. Assessment of the infection safety and plasma quality system for plasma fractionation. *Medical Newsletter of Vyatka*. 2016;(4):76–84 (In Russ.). EDN: [YFZWCV](https://doi.org/10.1159/000528959)
  - Чемоданов ИГ, Черкасов СИ, Мадзаев СР, Жибурт ЕБ. О сроке карантинизации донорской плазмы. *Бюллетень Национального научно-исследовательского института общественного здоровья имени Н.А. Семашко*. 2018;(1):80–5. Chemodanov IG, Cherkasov SN, Madzaev SR, Zhiburt EB. About length of donor plasma quarantine. *Bulletin of Semashko National Research Institute of Public Health*. 2018;(1):80–5 (In Russ.). EDN: [XREABF](https://doi.org/10.1159/000528959)
  - Garraud O, Martinaud C. The plasma supply in France. *Transfus Apher Sci*. 2019;58(4):358–62. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.06.004>
  - Fiedler SA, Oberle DF, Henseler O, et al. Follow-up of plasma donors after quarantine storage: Results of a 5-years survey in Germany. *Transfus Med Hemother*. 2022;50(1):26–9. <https://doi.org/10.1159/000525747>
  - Klanderma RB, van Mourik N, Eggermont D, et al. Incidence of transfusion-related acute lung injury temporally associated with solvent/detergent plasma use in the ICU: A retrospective before and after implementation study. *Transfusion*. 2022;62(9):1752–62. <https://doi.org/10.1111/trf.17049>
  - Губанова МН, Чемоданов ИГ, Гайворонская ВВ и др. Инактивация патогенов в клеточных компонентах крови. *Трансфузиология*. 2017;18(3):15–36. Gubanova MN, Chemodanov IG, Gaivoronskaya VV, et al. Inactivation of pathogens in cellular components. *Transfusiology*. 2017;18(3):15–36 (In Russ.). EDN: [UWRLFE](https://doi.org/10.1159/000525747)
  - Kaur G, Kaur P. Syphilis testing in blood donors: an update. *Blood Transfus*. 2015;13(2):197–204. <https://doi.org/10.2450/2014.0146-14>
  - D'aes T, van de Sande D, Buck ED, et al. Does cold storage of blood before transfusion prevent the transmission of syphilis? A systematic review and meta-analysis. *Vox Sang*. 2024;119(3):219–31. <https://doi.org/10.1111/vox.13554>
  - Farrugia A. Plasma for fractionation: Safety and quality issues. *Haemophilia*. 2004;10(4):334–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2004.00911.x>

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещена *таблица S1*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-28-41-table-s1>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **О.А. Демидова** — написание текста рукописи, формулирование выводов; **О.Г. Корнилова** — концепция работы, редактирование и критический пересмотр текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **О.В. Муслимова** — сбор, анализ и систематизация данных литературы; **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-2026-26-1-28-41-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 and formulated the conclusions. **O.G. Kornilova** conceptualized the work, critically revised and edited the manuscript, and approved the final version for publication. **O.V. Muslimova** collected, analyzed, and systematized literature data. **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>

**Муслимова Ольга Валерьевна**, канд. мед. наук / **Olga V. Muslimova**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1009-9609>

**Багирова Валерия Леонидовна**, д-р фарм. наук, проф. / **Valeria L. Bagirova**, Dr. Sci. (Pharm.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0379-6158>

Поступила 01.12.2025

После доработки 17.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Received December 1, 2025

Revised February 17, 2026

Accepted March 13, 2026

## Chikungunya virus-specific pre-existing T cell responses in naïve donors and B cell epitopes in seropositive individuals and experimentally infected mice

Aleksandra A. Nikonova<sup>1</sup>, Alina S. Poroshina<sup>2</sup>, Tatiana G. Samartseva<sup>1</sup>, Anastasia G. Samartseva<sup>1</sup>, Anastasia D. Adelfinskaya<sup>1</sup>, Bana Tahhan<sup>3</sup>, Nadezda N. Shershakova<sup>2</sup>, Musa R. Khaitov<sup>2</sup>, Alexey S. Oksanich<sup>1,3</sup>, George M. Ignatyev<sup>1</sup>, Vitaly V. Zverev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Center Institute of Immunology, 24 Kashirskoe Hwy, Moscow 115522, Russian Federation

<sup>3</sup> MIREA – Russian Technological University, 78 Vernadsky Ave, Moscow 119454, Russian Federation

✉ Aleksandra A. Nikonova; [nikonova.sasha@gmail.com](mailto:nikonova.sasha@gmail.com)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Chikungunya virus (CHIKV) poses a major public health challenge in endemic regions due to the lack of specific preventive measures and effective antiviral therapies. Understanding and identifying viral epitopes through rigorous research directly supports the development of more effective next-generation vaccines.

**AIM.** This study aimed to investigate the presence of pre-existing CHIKV-specific T cell memory in unexposed individuals and identified the B cell epitopes targeted in both seropositive donors and CHIKV-infected murine models.

**MATERIALS AND METHODS.** Peripheral blood from 34 healthy volunteers and sera from four CHIKV-seropositive individuals, as well as from BALB/c mice immunized with a non-lethal CHIKV strain, were analyzed to assess T- and B-cell responses. Five synthetic peptides (21–29 aa) derived from nsP2, nsP3, nsP4, and E2 proteins were selected using the immunogenicity prediction algorithm from the Immune Epitope Database and synthesized to encompass predicted epitopes with flanking residues. Peripheral blood mononuclear cells from unexposed donors were stimulated with peptides (1.2 µg/mL), and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell proliferation was evaluated by carboxy-fluorescein succinimidyl ester (CFSE)-based flow cytometry. Human and mouse sera were tested for peptide-specific IgG by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Epitope localization was visualized on 3D protein models using UCSF ChimeraX software and web server I-TASSER.

**RESULTS.** T cell proliferation assays with CFSE labeling revealed preexisting CD4<sup>+</sup>, but not CD8<sup>+</sup>, T cell responses to peptides from nonstructural (nsP2–4) and structural (E2) CHIKV proteins in seronegative donors ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Linear B cell epitopes within nsP3, nsP4, and E2 were identified by ELISA in sera from CHIKV-seropositive donors and CHIKV-infected mice. These epitopes were subsequently mapped onto 3D models of CHIKV proteins (E2, amino acids 3140–3161; nsP3, amino acids 1801–1823; nsP4, amino acids 2207–2256).

**CONCLUSIONS.** Our findings indicate the presence of preexisting CD4<sup>+</sup> T cell responses in antigen-naïve individuals and underscore the importance of experimentally validating *in silico*-predicted epitopes for advancing serological diagnostics and vaccine development.

### Keywords:

Chikungunya virus; T-cells; B-cells; antibody; peptides; epitopes; *in silico* modeling; immunity; immunogenicity

**For citation:** Nikonova A.A., Poroshina A.S., Samartseva T.G., Samartseva A.G., Adelfinskaya A.D., Tahhan B., Shershakova N.N., Khaitov M.R., Oksanich A.S., Ignatyev G.M., Zverev V.V. Chikungunya virus-specific pre-existing T cell responses in naïve donors and B cell epitopes in seropositive individuals and experimentally infected mice. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(1):42–53. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-42-53>

**Funding.** Results reported in this publication have been obtained under support of the Russian Science Foundation (Grant No. 22-14-00184).

**Disclosure.** Musa R. Khaitov and George M. Ignatyev have been Deputy Editors-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021 and 2024, respectively. The other authors declare no conflict of interest.

## Т-клеточные иммунные ответы к вирусу Чикунгунья у неинфицированных доноров и анализ В-клеточных эпитопов у серопозитивных лиц и экспериментально инфицированных мышей

А.А. Никонова<sup>1</sup>, А.С. Порошина<sup>2</sup>, Т.Г. Самарцева<sup>1</sup>, А.Г. Самарцева<sup>1</sup>, А.Д. Адельфинская<sup>1</sup>, Б. Тахан<sup>3</sup>, Н.Н. Шершакова<sup>2</sup>, М.Р. Хаитов<sup>2</sup>, А.С. Оксанич<sup>1,3</sup>, Г.М. Игнатьев<sup>1</sup>, В.В. Зверев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный пер., д. 5а, Москва, 105064, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Каширское шоссе, д. 24, Москва, 115522, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет», просп. Вернадского, д. 78, Москва, 119454, Российская Федерация

✉ Никонова Александра Александровна; [nikonova.sasha@gmail.com](mailto:nikonova.sasha@gmail.com)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Вирус Чикунгунья (ВЧИК) представляет серьезную проблему для общественного здравоохранения в эндемичных регионах вследствие отсутствия специфических профилактических мер и эффективной противовирусной терапии. Идентификация и характеристика вирусных эпитопов играют ключевую роль в разработке вакцин нового поколения.

**ЦЕЛЬ.** Исследование Т-клеточных иммунных ответов к ВЧИК у серонегативных доноров и идентификация В-клеточных эпитопов у серопозитивных лиц и на модели ВЧИК-инфекции у мышей.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Образцы периферической венозной крови 34 здоровых добровольцев, сыворотки крови 4 серопозитивных лиц и мышей линии BALB/c, иммунизированных нелетальным штаммом ВЧИК, были проанализированы для оценки Т- и В-клеточных иммунных ответов. Пять синтетических пептидов длиной 21–29 аминокислотных остатков, соответствующих участкам белков nsP2, nsP3, nsP4 и E2 ВЧИК, были отобраны с использованием алгоритма прогнозирования иммуногенности базы данных Immune Epitope Database и далее синтезированы с включением фланкирующих аминокислотных остатков, охватывающих предсказанные эпитопы. Мононуклеарные клетки периферической крови доноров, не подвергавшихся воздействию вируса, стимулировали пептидами в концентрации 1,2 мкг/мл, после чего пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток оценивали методом проточной цитометрии с использованием красителя – сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE). Пептид-специфические иммуноглобулины G в сыворотке крови человека и мышей определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Локализацию

эпитопов визуализировали на 3D-моделях белков с использованием программы UCSF ChimeraX и веб-сервера I-TASSER.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Анализ пролиферации Т-клеток с использованием CFSE выявил наличие CD4<sup>+</sup>, но не CD8<sup>+</sup> Т-клеточных иммунных ответов к пептидам структурного E2 и неструктурных nsP2–4 и белков ВЧИК у серонегативных доноров ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ). ИФА показал, что в образцах сыворотки крови ВЧИК-серопозитивных доноров и мышей, инфицированных ВЧИК, были идентифицированы линейные В-клеточные эпитопы, соответствующие участкам nsP3, nsP4 и E2 белков. Данные эпитопы были картированы на трехмерные модели белков ВЧИК: E2 – аминокислотные остатки в положениях 3140–3161, nsP3 – 1801–1823 и nsP4 – 2207–2256.

**ВЫВОДЫ.** Анализ результатов исследования позволяет сделать заключение о наличии CD4<sup>+</sup> Т-клеточных иммунных ответов у лиц, не подвергавшихся воздействию вирусных антигенов, и подчеркивает важность экспериментальной верификации эпитопов, предсказанных *in silico*, для совершенствования серологической диагностики и разработки вакцин против ВЧИК.

**Ключевые слова:** вирус Чикунгунья; Т-клетки; В-клетки; антитела; пептиды; эпитопы; *in silico* моделирование; иммунитет; иммуногенность

**Для цитирования:** Никонова А.А., Порошина А.С., Самарцева Т.Г., Самарцева А.Г., Адельфинская А.Д., Тахан Б., Шершакова Н.Н., Хаитов М.Р., Оксанич А.С., Игнатьев Г.М., Зверев В.В. Т-клеточные иммунные ответы к вирусу Чикунгунья у неинфицированных доноров и анализ В-клеточных эпитопов у серопозитивных лиц и экспериментально инфицированных мышей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2026;26(1):42–53. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-42-53>

**Финансирование.** Результаты, представленные в данной публикации, получены при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00184).

**Потенциальный конфликт интересов.** М.Р. Хаитов и Г.М. Игнатьев – заместители главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2021 и 2024 г. соответственно. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## INTRODUCTION

Chikungunya virus (CHIKV), an Alphavirus of the *Togaviridae* family, is transmitted to humans through the bite of female *Aedes mosquitoes* [1]. It is an enveloped virus with a single-stranded, positive-sense RNA genome of approximately 11.8 kb. The genome contains two open reading frames that encode four nonstructural proteins (nsP1–4) required for viral replication, three major structural proteins (Capsid, E1, and E2), and two small cleavage products (E3 and 6K) [2]. The first recognized outbreak of CHIKV occurred in Tanzania in 1952–1953 [3]. Since that time, the virus has spread to more than 100 countries in tropical and subtropical regions, causing millions of reported cases globally [4]. The detection of nearly 8,000 CHIKV cases in the Southern China since June 2025 highlights the growing public health impact of this arboviral infection [5]. In humans, CHIKV initially replicates in skin fibroblasts and subsequently disseminates to the liver, muscle, joints, lymph nodes, spleen, and brain [1]. CHIKV infection causes inflammatory musculoskeletal disease in humans, characterized by debilitating symptoms such as arthralgia, arthritis, and myalgia [6].

The host response to CHIKV infection begins locally in the skin at the site of the mosquito bite,

where the cutaneous immune system provides the first line of defense. During the acute phase, the virus disseminates from this initial site of replication to primary target tissues. This phase lasts for 7–14 days and is characterized by viremia, clinical symptoms, and the production of anti-CHIKV IgM antibodies [1, 7]. Active viral replication triggers the innate immune response, characterized by the production of type I interferons [1]. The early acute phase is mediated by CD8<sup>+</sup> T cell responses, followed by a predominance of CD4<sup>+</sup> T cells at later stages of infection [8]. The post-acute phase of CHIKV infection is characterized by viral clearance mediated by neutralizing antibodies (predominantly IgG) and elimination of infected cells by NK cells, CD8<sup>+</sup> T cells, and neutrophils, leading to disease resolution [9].

Approximately 30% of individuals develop chronic disease characterized by persistent arthralgia and arthritis [1, 10]. Multiple studies indicate that CHIKV can evade CD8<sup>+</sup> T cell responses, which may promote chronic infection within joint tissues [11]. Due to T cell receptor (TCR) cross-reactivity, pre-existing memory phenotype T cells have been identified among human antigen-specific CD4<sup>+</sup> lymphocytes, even in the absence of known viral exposure [12].

Despite significant progress in understanding humoral responses to CHIKV, the role of cellular immunity in protection and pathogenesis remains insufficiently defined. In particular, it is unclear whether pre-existing T cell memory against CHIKV exists in antigen-naïve individuals and how different viral proteins contribute to antibody recognition. This lack of knowledge limits the development of immunodiagnostic tools and rational vaccine design. We hypothesized that predicted *in silico* CHIKV peptides could contain epitopes capable of activating pre-existing CD4<sup>+</sup> T cells in unexposed donors and inducing B cell responses in seropositive individuals and infected mice.

The aim of this study was to investigate the presence of pre-existing CHIKV-specific T cell memory responses in unexposed individuals and to identify B cell epitopes targeted in seropositive donors and CHIKV-infected murine model.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

**Human samples collection.** Peripheral blood samples were collected from 34 healthy volunteers (age 31±10 years; 11 women and 23 men) residing in the Moscow region. Ethics approval for both human and animal studies (Protocol No. 6, dated March 4, 2023) was obtained from the Local Research Ethics Committee of the I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera. Written informed consent was obtained from all human participants in accordance with the Declaration of Helsinki (2013 revision), the International Council for Harmonisation Good Clinical Practice (ICH-GCP) guidelines, and the national regulations of the Russian Federation, including Federal Law No. 323-FZ<sup>1</sup>, On the Fundamentals of Health Protection of Citizens in the Russian Federation.

**Animals.** All animal procedures, including euthanasia by cervical dislocation under light ether anesthesia, were performed in accordance with the institutional guidelines of the Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. Female BALB/c mice (6–8 weeks old; Stolbovaya, Moscow, Russia) were randomly assigned to two groups: CHIKV-infected ( $n=9$ ) and PBS-treated control ( $n=9$ ) (Phosphate-Buffered Saline, Cat. No. P060E, Paneco, Russia). Each group consisted of three independent pools (3 mice per pool). Animals were housed in a pathogen-free facility under standard conditions (22±2 °C, 50–60% humidity, 12 hours

light/dark cycle) with free access to food and water. Environmental enrichment was provided with nesting material and shelters.

All manipulations, including virus inoculation and blood collection, were performed under ether anesthesia to minimize pain and distress. No animals were excluded from the study, and daily health monitoring was conducted by trained personnel.

**Virus strain.** The CHIKV strain Nika2021 (GenBank Acc. No. OQ320495) [13] was propagated in *Aedes albopictus* clone C6/36 cells (ATCC) and used for mouse immunization.

### Methods

**Mouse immunization.** BALB/c mice were immunized intraperitoneally with a non-lethal CHIKV strain Nika2021 (100 TCID<sub>50</sub> per mouse) twice at two-week intervals. Serum samples were collected two weeks after the final immunization. Control mice received PBS injections. Sera from three mice per group were pooled, and experiments were repeated independently three times ( $n=3$  pools). Sera were analyzed for peptide-specific IgG by ELISA as described below.

**Peptides design and synthesis.** Five synthetic peptides derived from nsP2, nsP3, nsP4, and E2 proteins of CHIKV were selected from the Immune Epitope Database (IEDB) as regions with predicted high immunogenic potential [14]. The IEDB immunogenicity algorithm, trained on a large dataset of experimentally validated T cell epitopes, distinguishes immunogenic from non-immunogenic sequences by evaluating amino acid properties and their positional context within the peptide. For each viral protein, the peptide region with the highest immunogenicity score (0.18–0.26) was selected. To enable natural processing and presentation across multiple HLA alleles, and to evaluate both T and B cell responses, extended peptides of 21–29 aa encompassing the predicted core epitopes and adjacent flanking residues were synthesized. Peptides were produced by the "Human proteome" Core Facility at the Institute of Biomedical Chemistry (Moscow, Russia) (Table 1) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at ~1800 pmol/μL.

**T cell proliferation assay.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy donors ( $n=12$ ) by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Cells were resuspended in serum-free medium (Cat. No. 12-725F, UltraCULTURE™, Lonza, Switzerland) and seeded in 96-well round-bottom plates ( $2 \times 10^5$  cells/well).

<sup>1</sup> Federal Law No. 323-FZ "On the Fundamentals of Health Protection of Citizens in the Russian Federation".

Carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE, (Cat. No. C34554, Invitrogen, USA) was added at a final concentration of 0.00002 mM. CFSE-labeled cells were stimulated with peptides at concentrations 1.2 µg/mL for 7 days. Anti-CD3/CD28 Dynabeads™ (Cat. No. 11131D, Gibco, USA) were used as positive control, and medium alone as negative control.

After culture, cells were stained with the eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 660 (Cat. No. 65-0865-14, eBioscience, USA) and surface anti-human CD3, CD4, CD8 antibodies (Cat. No. 12-0038-42, 25-0049-42, A15448, respectively, eBioscience). Nonspecific binding was blocked with 10% normal mouse serum (Cat. No. 10410, Invitrogen, USA). Flow cytometry was performed on a BD FACSCanto II (BD Biosciences, USA), and data were analyzed using FlowJo v10.6.2 (BD Biosciences, USA). To quantify proliferation, viable CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells were gated, and the proportion of CFSE<sup>low</sup> cells was determined (Figure 1).

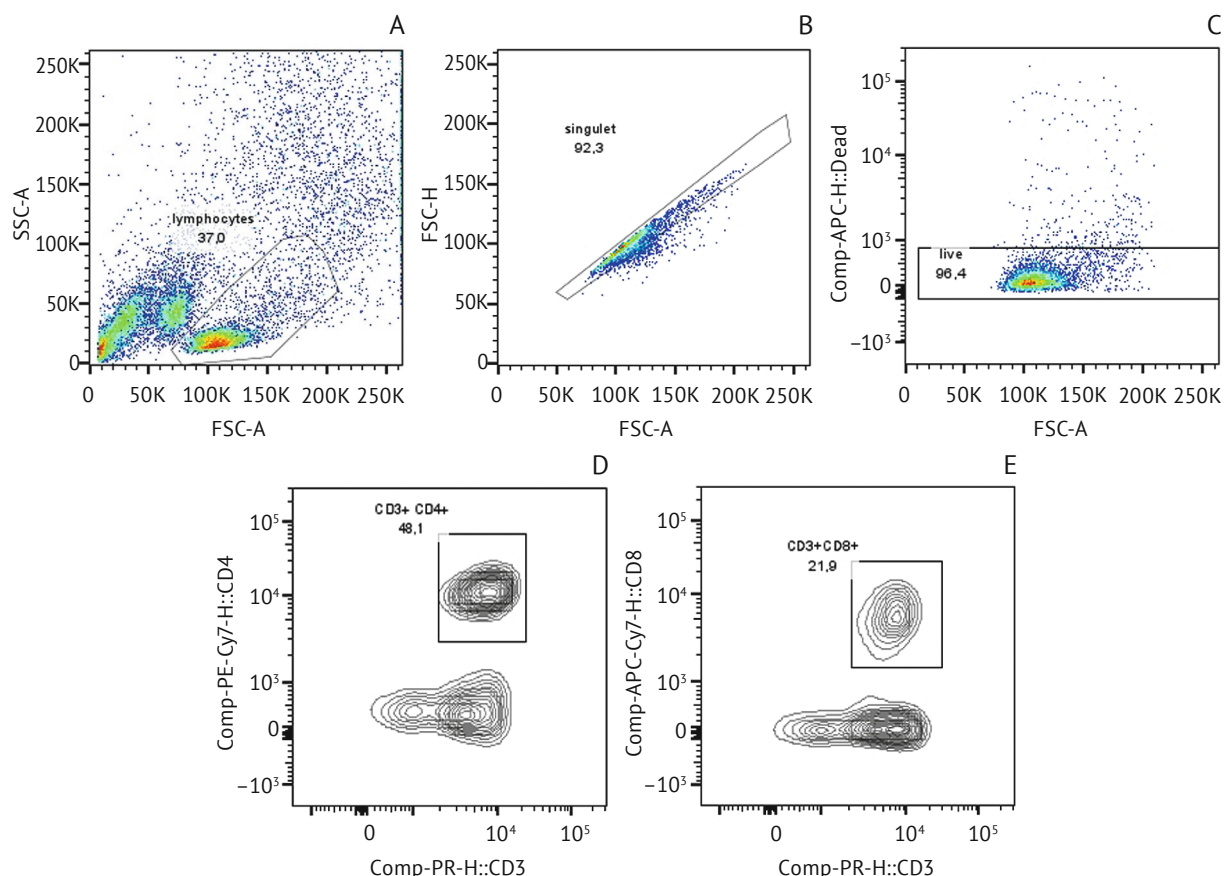
**Table 1.** Sequences of linear peptides identified by *in silico* analysis

**Таблица 1.** Последовательности линейных пептидов, идентифицированных *in silico*

Peptide name <i>Название пептида</i>	Sequence <i>Последовательность</i>
D03-NSP1	CPMRSAEDPERLANYARKLAS
C04-NSP2	TDEESYELVRAERTEHEVYVDVD
D01-NSP3	GASSETFPITFGDFNEGEIESL
C02-NSP4	LFDMSAEDFDAIIAAHFKPGDVTLETDIA
D02-E2	LSTNGTAHGHPHEIILYYEL

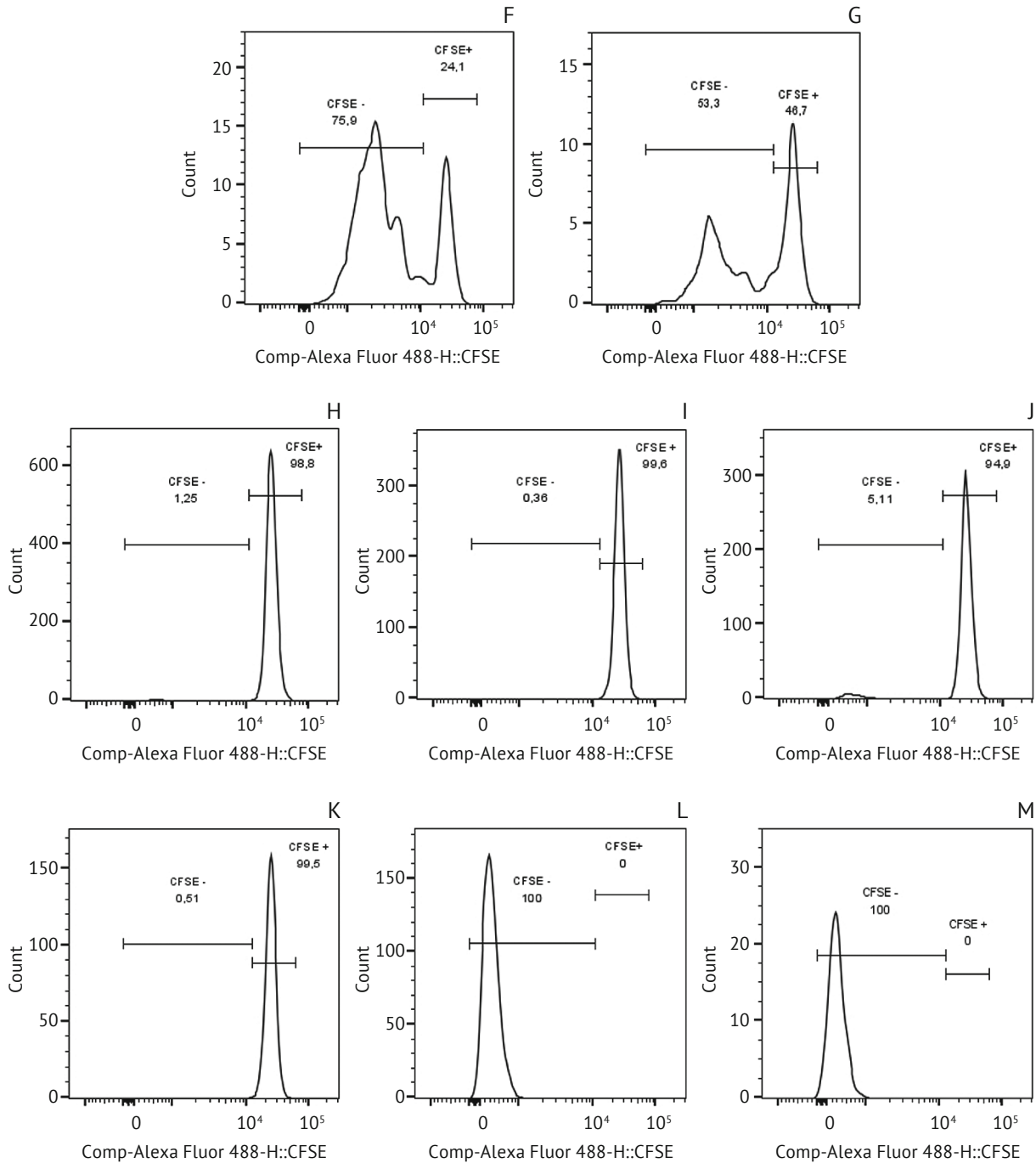
#### Identification of CHIKV B-cell epitopes by ELISA.

Five peptides (Table 1) were biotinylated using a Biotin Protein Labeling Kit (Roche, Switzerland). Streptavidin-coated plates (Biomat, Italy) were loaded with 12 pmol/well of peptide and incubated with serum samples (human or murine). Human sera included CHIKV-IgG-positive ( $n=4$ ) and negative ( $n=18$ ) samples confirmed by



**Fig. 1.** Gating strategy for analysis of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells proliferation using cell-tracking dye carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Flow cytometry was performed on human peripheral blood mononuclear cells ( $n=12$ ). The lymphocytes were gated based on the forward versus side scatter (A) and after the exclusion of debris, doublets and dead cells (A–C), CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were identified on the gated CD3<sup>+</sup> cells (D, E). The intensity of CFSE was evaluated on the gated CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (F, H, J, L) and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells (G, I, K, M). To determine T cell proliferation the percentages of CFSE positive and negative cells were determined on the gated

Continued on the next page / Продолжение на следующей странице



cells. Dot plot and histogram examples showing the percentage of CFSE positive and negative CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells from one of the analyzed samples (A–M) treated with Dynabeads™ (F and G, positive control), media (H and I, negative control), C04-NSP2 peptide at 1.2 µg/mL (J and K), respectively. Histograms (L, M) demonstrating CFSE unstained cells.

**Рис. 1.** Алгоритм анализа пролиферации CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток с использованием красителя сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE). Проточную цитометрию проводили с использованием мононуклеаров периферической крови человека ( $n=12$ ). Идентификация лимфоцитов проводилась с помощью диаграммы бокового – прямого (FSS–SSC) светорассеяния (A), после исключения дуплетов и мертвых клеток из анализа (A–C) идентифицировали популяции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток (D, E). Интенсивность окрашивания CFSE оценивали в CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (F, H, J, L) и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клетках (G, I, K, M). Для оценки пролиферации Т-клеток определяли процентное соотношение CFSE-положительных и отрицательных клеток в идентифицированных лимфоцитах. На рисунке представлены примеры точечных диаграмм и гистограмм, отражающих долю CFSE-положительных и CFSE-отрицательных CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток в одном из анализируемых образцов (A–M): стимуляция Dynabeads™ (F, G – положительный контроль), культивирование в питательной среде (H, I – отрицательный контроль) и обработка пептидом C04-NSP2 в концентрации 1,2 мкг/мл (J, K). Гистограммы (L, M) демонстрируют клетки, не окрашенные CFSE.

commercial ELISA (Bioservice BTC, Russia). Mouse sera were collected from CHIKV-infected or PBS-treated animals. Bound IgG was detected with HRP-conjugated anti-human or anti-mouse IgG (Bioservice BTC, Russia) and developed with TMB substrate. Absorbance was read at 450 nm with a 620 nm reference in a microplate autoreader (Erba Mannheim, Germany). A peptide was considered to contain a positive B cell epitope when OD values obtained with CHIKV-positive sera exceeded the mean +3 SD of negative sera.

#### **Computational modeling of protein structures.**

Structural data for nsP4 were obtained from the Protein Data Bank (PDB ID: 7Y38) [15] and visualized with UCSF ChimeraX software [16]. Predicted 3D structures of nsP3 and E2 were generated using I-TASSER [17] and visualized with UCSF ChimeraX [16].

**Statistical analysis.** The Shapiro – Wilk test for normality was performed. Data were presented as means ±SD (standard deviation) for parametric analyses and as medians ± interquartile range for nonparametric analyses, as indicated in the figure legends. Statistical analyses were performed using Prism 8 (GraphPad Software). For not normally distributed data the Kruskal – Wallis test followed by post-hoc testing (if the Kruskal – Wallis was significant) using un-paired Mann – Whitney *U*-tests was performed, as mentioned in the respective figure legends. Data were accepted as significantly different when *p*-value <0.05.

## **RESULTS**

### **Ex vivo CHIKV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses in unexposed donors**

Predicted CHIKV peptides (Table 1) were tested for their ability to induce T cell proliferation in PBMCs from seronegative donors. Cells were CFSE-labeled, cultured with peptides at 1.2 µg/mL for 7 days and analyzed by flow cytometry (Figure. 2A). Significant proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells was observed in response to peptides C04-NSP2, D01-NSP3, C02-NSP4, and D02-E2 (*P*<0.05, *P*<0.01) compared with unstimulated control (Figure 2A). No significant proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells was detected at either peptide concentration. As expected, stimulation with anti-CD3/CD28 Dynabeads™ (Gibco, USA) induced robust proliferation of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (*P*<0.0001).

### **Mapping of CHIKV protein regions recognized by human and mouse antibodies**

Biotinylated peptides were tested by ELISA with sera from CHIKV-seropositive and seronegative

donors (Figure 3A). Three peptides D01-NSP3, C02-NSP4 and D02-E2 were consistently recognized by antibodies from CHIKV-positive individuals but not by seronegative controls. The same peptides were further analyzed using sera from CHIKV-infected mice. At both 1:100 and 1:200 dilutions, sera from infected animals showed strong reactivity to these peptides, whereas sera from PBS-treated controls did not (Figure 3B).

### **Structural localization of antigenic regions recognized by CD4<sup>+</sup> T cells and antibodies**

Epitope-containing regions identified in functional assays were mapped onto the 3D structure of nsP4 (PDB ID: 7Y38) and onto I-TASSER-predicted models of nsP3 and E2 (Figure 4A–C). The epitope within the E2 protein (amino acids residues 3140–3161) was located on the protein surface (Figure 4A, D). In contrast, the regions mapped to nsP3 (amino acids residues 1801–1823) and nsP4 (amino acids residues 2207–2256) were embedded within the folded structures (Figure 4B–D).

## **DISCUSSION**

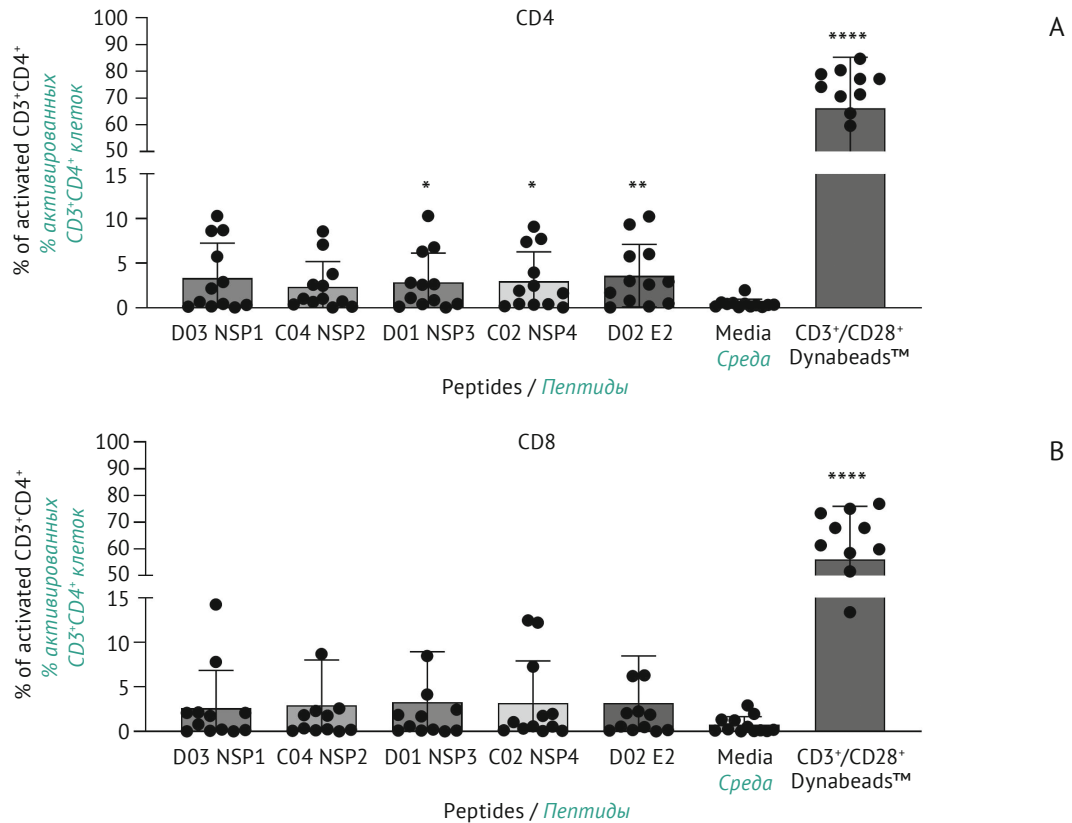
In November 2023, the FDA approved the first live-attenuated CHIKV vaccine, marking an important step toward controlling this disease<sup>2</sup>. Several other vaccine candidates are in development or clinical trials, underscoring the continued global relevance of CHIKV [18]. However, these vaccines are not yet widely accessible, and detailed understanding of the immune mechanisms that contribute to protection remains limited.

A better understanding of T cell immunity and precise definition of immunogenic epitopes remain critical for vaccine design and diagnostic tools. CHIKV persistence in lymphoid and joint-associated tissues is thought to result from incomplete viral clearance despite the presence of specific antibodies [19]. Evidence also suggests that CHIKV can evade CD8<sup>+</sup> T cell and B cell responses [20, 21].

While *in silico* analyses have identified numerous candidate CHIKV B cell and T cell epitopes [22, 23], only a limited number of these predictions have been experimentally validated to date [24]. In this study, we sought to evaluate preexisting T cell responses in healthy donors using linear peptides derived from CHIKV proteins (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, and E2). Particular attention was given to the repertoire of CD8<sup>+</sup> T cells in previously unexposed individuals, given the potential role of preexisting cell-mediated immunity in facilitating viral clearance [25].

T cells with a memory phenotype can be detected even in antigen-naïve individuals, a phenomenon

<sup>2</sup> <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-vaccine-prevent-disease-caused-chikungunya-virus>

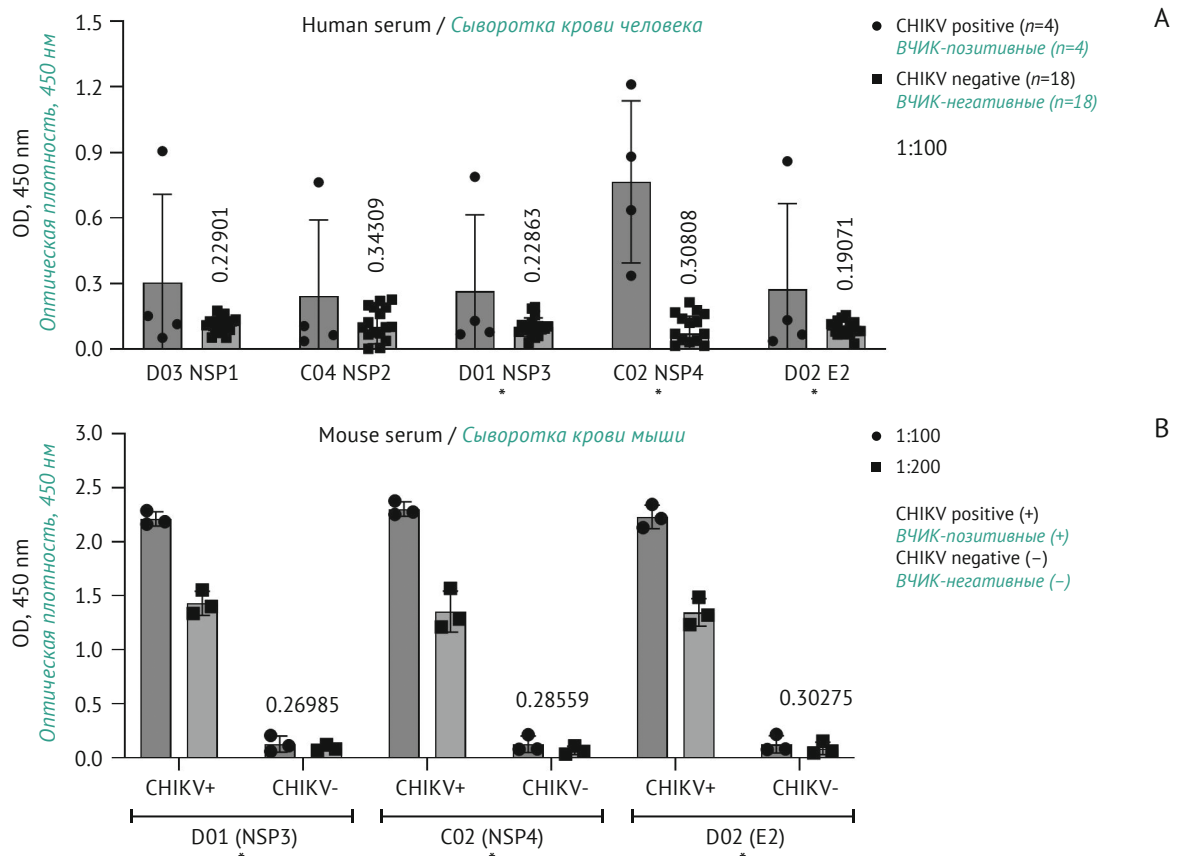


**Fig. 2.** Activation of Chikungunya virus (CHIKV)-specific CD4<sup>+</sup> (A) and CD8<sup>+</sup> (B) T lymphocytes isolated from blood of healthy donors ( $n=12$ ). A, proliferation level of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T lymphocytes; B, proliferation level of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. The proliferation was evaluated by flow cytometry using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Peripheral blood mononuclear cells were isolated from the blood of healthy donors by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation and stimulated with CHIKV-derived peptides at concentrations 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 7 days. The Dynabeads<sup>™</sup> Human T-Activator CD3/CD28 and cells treated with media alone were used as positive and negative control, respectively. Differences between multiple groups were estimated using a Kruskal – Wallis test followed by post-hoc testing (if the Kruskal – Wallis criterion was significant) using un-paired Mann – Whitney  $U$ -tests. Horizontal bars and error bars are medians + interquartile range (12 donors). \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*\*  $P<0.0001$ . Abbreviations: nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, nonstructural protein 1, 2, 3, 4, respectively; E2, envelope protein 2.

**Рис. 2.** Активация CD4<sup>+</sup> (A) и CD8<sup>+</sup> (B) Т-лимфоцитов, специфичных к вирусу Чикунгунья (ВЧИК), выделенных из крови здоровых доноров ( $n=12$ ). А – уровень пролиферации Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>; В – уровень пролиферации Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Проллиферацию оценивали методом проточной цитометрии с использованием сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE). Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из крови здоровых доноров путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-гипак и стимулировали специфичными пептидами к ВЧИК в концентрации 1,2 мкг/мл в течение 7 сут. В качестве положительного и отрицательного контролей использовали реагент Dynabeads<sup>™</sup> Human T-Activator CD3/CD28 и клетки, обработанные только питательной средой, соответственно. Различия между группами оценивали с помощью критерия Краскела – Уоллиса с последующим апостериорным тестированием (если критерий Краскела – Уоллиса был значимым) с использованием непарных  $U$ -критериев Манна – Уитни. Горизонтальные полосы и планки погрешностей представляют собой медианные значения и межквартильные размахи ( $n=12$ ). \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*\*  $P<0,0001$ . Сокращения: nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 – неструктурные белки 1, 2, 3, 4, соответственно; E2 – оболочечный белок 2; media – питательная среда.

explained by T cell cross-reactivity and described for several viral infections [12, 26, 27]. Based on this concept, we tested *in silico*-selected CHIKV peptides *ex vivo* in seronegative donors to assess the presence of preexisting T cell responses. The peptides were selected using the IEDB immunogenicity prediction algorithm, which evaluates amino acid composition and positional context to distinguish immunogenic from non-immunogenic regions [14]. For each protein, we chose one of the top-scoring regions and synthesized extended 21–29 aa peptides. The use of such extended peptides

is consistent with previous strategies applied in both viral immunology and cancer vaccine research, where synthetic long peptides are deliberately designed to include the predicted epitope core and additional flanking residues. These long peptides can be naturally processed by antigen-presenting cells, thereby allowing simultaneous stimulation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses as well as recognition by B cells [28, 29]. Although this differs from the minimal epitope approach commonly used in CD8<sup>+</sup> T cell assays, it provides a physiologically relevant framework to validate *in silico* predictions.

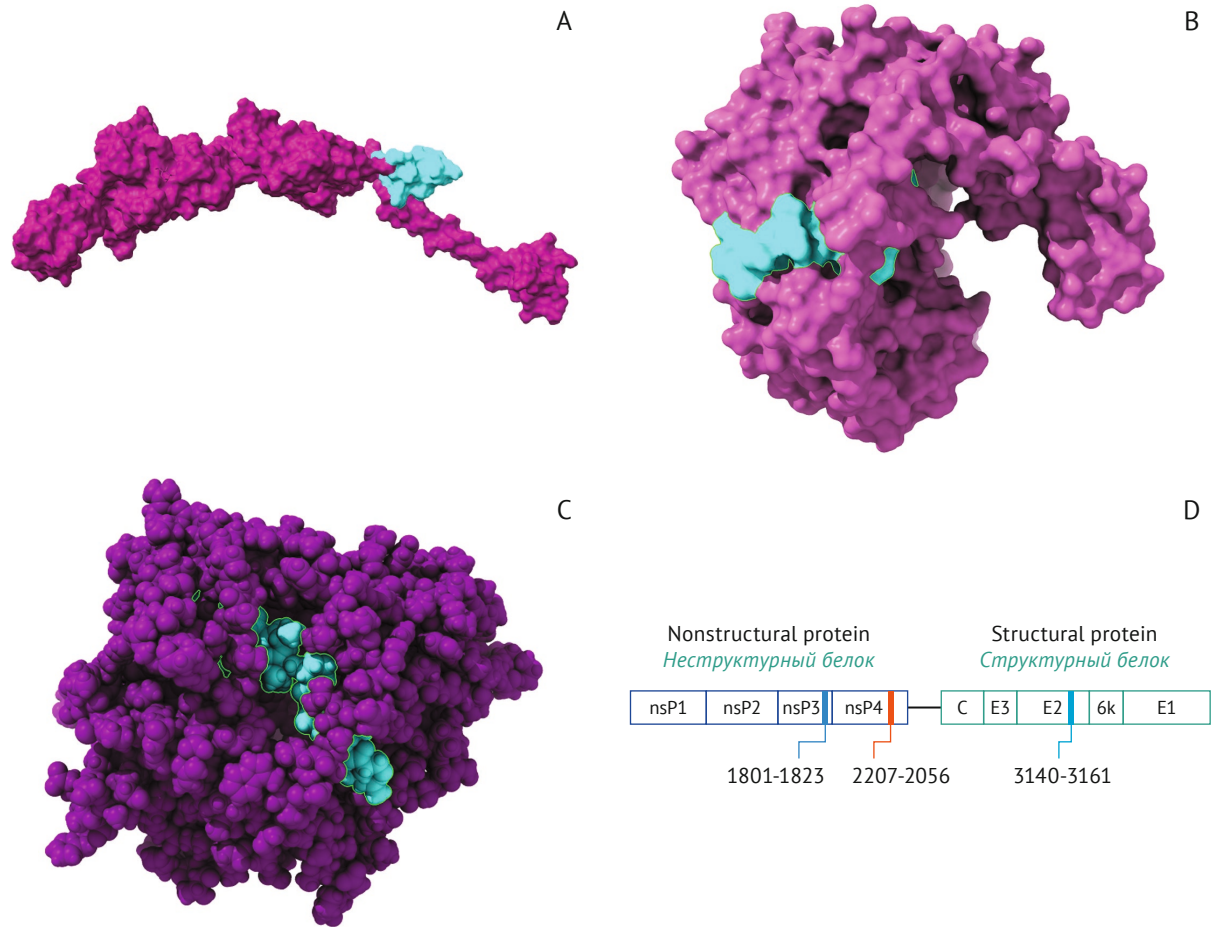


**Fig. 3.** Identification of Chikungunya virus (CHIKV) B cell epitopes. A, human blood sera from CHIKV-IgG-positive donors ( $n=4$ ) and CHIKV-IgG-negative controls ( $n=18$ ) were tested at 1:100 dilution in peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay using peptides derived from structural (E2) and nonstructural (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) proteins. B, mouse blood sera collected from CHIKV infected animals (CHIKV+,  $n=3$  pools of 3 mice each) or phosphate saline treated (CHIKV-,  $n=3$  pools) were tested at dilutions of 1:100 and 1:200. Peptides were considered positive linear B-cell epitopes when optical density at 450 nm ( $OD_{450}$ ) values from CHIKV-IgG-positive samples exceeded the mean plus 3 standard deviations of negative controls (cut-off values indicated above the chart bars). Data are shown as individual values with median and interquartile range. \*  $P<0.05$ . Abbreviations: nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, nonstructural protein 1, 2, 3, 4, respectively; E2, envelope protein 2.

**Рис. 3.** Идентификация В-клеточных эпитопов вируса Чикунгунья (CHIKV). А – образцы сыворотки крови CHIKV-IgG-позитивных доноров ( $n=4$ ) и CHIKV-IgG-негативных лиц, контроль ( $n=18$ ) анализировали в разведении 1:100 методом пептид-специфического иммуноферментного анализа с использованием пептидов, соответствующих участкам структурного (E2) и неструктурных (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) белков CHIKV. В – образцы сыворотки крови мышей, инфицированных CHIKV (CHIKV+,  $n=3$  пула по 3 особи в каждом), а также животных контрольной группы, обработанных фосфатно-солевым буфером (CHIKV-,  $n=3$  пула), тестировали в разведениях 1:100 и 1:200. Пептиды расценивали как положительные линейные В-клеточные эпитопы в случае, если значения оптической плотности при длине волны 450 нм ( $OD_{450}$ ) в образцах CHIKV-IgG-позитивных сывороток превышали среднее значение отрицательных контролей более чем на три стандартных отклонения (пороговые значения указаны над столбцами). Данные представлены в виде индивидуальных значений с указанием медианы и межквартильного размаха. \*  $P<0,05$ . Сокращения: nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 – неструктурные белки 1, 2, 3, 4, соответственно; E2 – оболочечный белок 2; ВЧИК – вирус Чикунгунья.

Our results demonstrated that several peptides, initially predicted as CD8 epitopes, induced proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells in unexposed donors, but not CD8<sup>+</sup> responses. However, given that extended peptides (21–29 aa) are not optimal for direct CD8<sup>+</sup> T cell stimulation, these findings should not be interpreted as evidence of an absence of CD8<sup>+</sup> responses to CHIKV. Rather, they highlight the need for further studies using minimal epitopes and HLA-matched donors to comprehensively assess the CD8<sup>+</sup> repertoire.

Furthermore, biotinylated peptides were tested in ELISA with CHIKV-seropositive and seronegative human serum samples as well as sera from CHIKV-infected and uninfected mice. These experiments demonstrated that the same CHIKV-derived peptides (nsP3, nsP4, and E2) were recognized by antibodies in both humans and mice (Figure 3). Notably, the regions identified included both structural (E2 glycoprotein) and nonstructural proteins (nsP3 and nsP4), indicating that humoral responses to CHIKV are not restricted to structural antigens.



**Fig. 4.** Structural localization of Chikungunya virus (CHIKV) CD4<sup>+</sup> T- and B-cell epitopes. A–C, identified epitope-containing regions are mapped onto models of CHIKV E2 (A), nsP4 (B), and nsP3 (C) proteins. D, schematic representation of the CHIKV proteome indicating the positions of the identified CD4<sup>+</sup> T cell and B cell epitopes. Structural mapping was performed using UCSF ChimeraX; the nsP4 structure was retrieved from the Protein Data Bank (PDB ID: 7Y38), while E2 and nsP3 models were generated using the I-TASSER server. Abbreviations: nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, nonstructural protein 1, 2, 3, 4, respectively; C, capsid protein; E1, E2, E3, envelope protein 1, 2, 3, respectively; 6k, 6k protein.

**Рис. 4.** Структурная локализация CD4<sup>+</sup> T- и B-клеточных эпитопов вируса Чикунгунья (CHIKV). A–C – участки белков, содержащие идентифицированные эпитопы, картированы на 3D-модели белков E2 (A), nsP4 (B) и nsP3 (C) вируса CHIKV. D – схематическое представление протеома вируса CHIKV с указанием расположения выявленных CD4<sup>+</sup> T- и B-клеточных эпитопов. Структурное картирование выполнено с использованием программы UCSF ChimeraX; структура белка nsP4 была получена из базы данных Protein Data Bank (PDB ID: 7Y38), тогда как 3D модели белков E2 и nsP3 были построены с использованием веб-сервера I-TASSER. Сокращения: nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 – неструктурные белки 1, 2, 3, 4, соответственно; C – белок капсида; E1, E2, E3 – оболочечный белок 1, 2, 3, соответственно; 6k – 6k белок.

These findings are consistent with the work of Yiu-Wing Kam et al., who demonstrated in experimentally infected macaques that antibody responses target multiple CHIKV proteins, including C, E2, nsP1, nsP3, and nsP4 [30].

Mapping of these epitopes onto structural models provided further biological context. The epitope within the E2 glycoprotein was surface-exposed, consistent with its role as the main structural target of the humoral response [30–32]. In contrast, the identified regions within nsP3 and nsP4 were located in buried regions of the folded proteins, which may influence their accessibility *in vivo*. Interestingly, the nsP3 epitope overlapped with the hypervariable

C-terminal region, a domain implicated in virus–host interactions and pathogenesis [33, 34].

This study has several limitations. Only a small number of peptides were tested, thus the results cannot be generalized to the entire CHIKV proteome. The use of extended 21–29 amino acid peptides differs from the typical lengths of CD8 (8–11 aa) and CD4 (<20 aa) epitopes and may have influenced the pattern of T cell activation. The number of CHIKV-seropositive human samples was small, and larger cohorts are needed to confirm the findings. Finally, functional antibody assays were restricted to peptide binding and did not directly assess neutralization.

## CONCLUSIONS

In summary, this study demonstrates the presence of preexisting CD4<sup>+</sup> T cell responses to selected CHIKV-derived peptides in unexposed individuals and identifies linear B cell epitopes within both structural (E2) and nonstructural (nsP3 and nsP4) proteins recognized by sera from seropositive donors and infected mice. While current CHIKV vaccine strategies mainly emphasize CD8<sup>+</sup> T cell-mediated protection,

CD4<sup>+</sup> T cells play a central role in supporting cytotoxic T lymphocyte responses, antibody maturation, and long-term immune memory. Therefore, the identification of CHIKV-specific CD4<sup>+</sup> T cell and B cell epitopes may contribute to a broader understanding of protective immunity and complement CD8-focused approaches. This fact may stimulate the development of diagnostic tools and support the rational design of next-generation vaccines.

## References/Литература

1. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):491–500. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368>
2. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.* 1994;58(3):491–562. <https://doi.org/10.1128/mr.58.3.491-562.1994>
3. Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *Int J Infect Dis.* 2017;58:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.006>
4. Costa LB, Barreto FKA, Barreto MCA, Santos T, et al. Epidemiology and economic burden of Chikungunya: A systematic literature review. *Trop Med Infect Dis.* 2023;8(6):301. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8060301>
5. Murphy F. China battles to control Chikungunya virus as 8000 cases are reported. *BMI.* 2025;390:r1699. <https://doi.org/10.1136/bmj.r1699>
6. De Lima Cavalcanti TYV, Pereira MR, De Paula SO, Franca RFO. A review on Chikungunya virus epidemiology, pathogenesis and current vaccine development. *Viruses.* 2022;14(5):969. <https://doi.org/10.3390/v14050969>
7. Jin J, Galaz-Montoya JG, Sherman MB, et al. Neutralizing antibodies inhibit Chikungunya virus budding at the plasma membrane. *Cell Host Microbe.* 2018;24(3):417–28.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.07.018>
8. Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, et al. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *J Infect Dis.* 2011;204(1):115–23. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq006>
9. Srivastava P, Kumar A, Hasan A, et al. Disease resolution in Chikungunya – What decides the outcome? *Front Immunol.* 2020;11:695. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00695>
10. Chopra A, Anuradha V, Ghorpade R, Saluja M. Acute Chikungunya and persistent musculoskeletal pain following the 2006 Indian epidemic: a 2-year prospective rural community study. *Epidemiol Infect.* 2012;140(5):842–50. <https://doi.org/10.1017/S0950268811001300>
11. Ware BC, Parks MG, Da Silva MOL, Morrison TE. Chikungunya virus infection disrupts MHC-I antigen presentation via nonstructural protein 2. *PLoS Pathog.* 2024;20(3):e1011794. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011794>
12. Su LF, Davis MM. Antiviral memory phenotype T cells in unexposed adults. *Immunol Rev.* 2013;255(1):95–109. <https://doi.org/10.1111/imir.12095>
13. Ignatyev GM, Oksanich AS, Kazakova EV, et al. Isolation and genetic analysis of the chikungunya virus from *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2023;100(5):310–8 (In Russ.). Игнатъев ГМ, Оксанич АС, Казакова ЕВ и др. Изоляция и генетический анализ вируса Чикунгунья из комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2023;100(5):310–8. EDN: UWGUMI
14. Calis JJ, Maybeno M, Greenbaum JA, et al. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Comput Biol.* 2013;9(10):e1003266. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003266>
15. Tan YB, Chmielewski D, Law MCY, et al. Molecular architecture of the Chikungunya virus replication complex. *Sci Adv.* 2022;8(48):eadd2536. <https://doi.org/10.1126/sciadv.add2536>
16. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera – A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605–12. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
17. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
18. Shaw CA, August A, Bart S, et al. A phase 1, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study to evaluate the safety and immunogenicity of an mRNA-based Chikungunya virus vaccine in healthy adults. *Vaccine.* 2023;41(26):3898–906. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.04.064>
19. Hawman DW, Stoermer KA, Montgomery SA, et al. Chronic joint disease caused by persistent Chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response. *J Virol.* 2013;87(24):13878–88. <https://doi.org/10.1128/JVI.02666-13>
20. Davenport BJ, Bullock C, Mccarthy MK, et al. Chikungunya virus evades antiviral CD8(+) T cell responses to establish persistent infection in joint-associated tissues. *J Virol.* 2020;94(9):e02036-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02036-19>
21. Hawman DW, Fox JM, Ashbrook AW, et al. Pathogenic Chikungunya virus evades B cell responses to establish persistence. *Cell Rep.* 2016;16(5):1326–38. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.076>
22. Poh CM, Chan YH, Ng LFP. Role of T cells in Chikungunya virus infection and utilizing their potential in anti-viral immunity. *Front Immunol.* 2020;11:287. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00287>
23. Venkatesan A, Chouhan U, Suryawanshi SK, Choudhari JK. An in silico approach for prediction of B cell and T cell epitope candidates against Chikungunya virus. *Immunol Med.* 2023;46(4):163–74. <https://doi.org/10.1080/25785826.2023.2202038>
24. Lorente E, Barriga A, Garcia-Arriaza J, et al. Complex antigen presentation pathway for an HLA-A\*0201-restricted epitope from Chikungunya 6K protein. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(10):e0006036. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006036>
25. Swadling L, Diniz MO, Schmidt NM, et al. Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2. *Nature.* 2022;601(7891):110–7. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04186-8>
26. Pothast CR, Dijkland RC, Thaler M, Hagedoorn RS, et al. SARS-CoV-2-specific CD4(+) and CD8(+) T cell responses can originate from cross-reactive CMV-specific T cells. *Elife.* 2022;11:e82050. <https://doi.org/10.7554/eLife.82050>
27. Elias G, Meysman P, Bartholomeus E, et al. Preexisting memory CD4 T cells in naive individuals confer robust immunity upon hepatitis B vaccination. *Elife.* 2022;11:e68388. <https://doi.org/10.7554/eLife.68388>
28. Rosalia RA, Quakkelaar ED, Redeker A, et al. Dendritic cells process synthetic long peptides better than

- whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *Eur J Immunol.* 2013;43(10):2554–65. <https://doi.org/10.1002/eji.201343324>
29. Slingluff CL Jr. The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination? *Cancer J.* 2011;17(5):343–50. <https://doi.org/10.1097/PP0.0b013e318233e5b2>
30. Kam YW, Lee WW, Simarmata D, et al. Unique epitopes recognized by antibodies induced in Chikungunya virus-infected non-human primates: implications for the study of immunopathology and vaccine development. *PLoS One.* 2014;9(4):e95647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095647>
31. Kam YW, Lee WW, Simarmata D, et al. Longitudinal analysis of the human antibody response to Chikungunya virus infection: implications for serodiagnosis and vaccine development. *J Virol.* 2012;86(23):13005–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.01780-12>
32. Silva J, Cunha MDP, Pour SZ, et al. Chikungunya virus E2 structural protein B-cell epitopes analysis. *Viruses.* 2022;14(8):1839. <https://doi.org/10.3390/v14081839>
33. Foy NJ, Akhrymuk M, Shustov AV, et al. Hypervariable domain of nonstructural protein nsP3 of Venezuelan equine encephalitis virus determines cell-specific mode of virus replication. *J Virol.* 2013;87(13):7569–84. <https://doi.org/10.1128/JVI.00720-13>
34. Foy NJ, Akhrymuk M, Akhrymuk I, et al. Hypervariable domains of nsP3 proteins of New World and Old World alphaviruses mediate formation of distinct, virus-specific protein complexes. *J Virol.* 2013;87(4):1997–2010. <https://doi.org/10.1128/jvi.02853-12>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Nikonova** conceptualized the study, drafted the manuscript, formulated the conclusions. **A.S. Poroshina, T.G. Samartseva, A.G. Samartseva, A.D. Adelfinskaya, B. Tahhan, and N.N. Shershakova** carried out experiments. **M.R. Khaitov, A.S. Oksanich, G.M. Ignatyev,** and **V.V. Zverev** participated in formulating the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

**Ethics approval.** The study protocols involving human subjects and experimental animals were approved by the Local Research Ethics Committee of the I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera (Protocol No. 6 dated March 4, 2023).

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Никонова** – концепция работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; **А.С. Порошина, Т.Г. Самарцева, А.Г. Самарцева, А.Д. Адельфинская, Б. Тахан, Н.Н. Шершакова** – проведение экспериментов; **М.Р. Хаитов, А.С. Оксанич, Г.М. Игнатъев, В.В. Зверев** – участие в формулировании выводов, утверждение окончательной версии рукописи для публикации. **Соответствие принципам этики.** Исследования с участием добровольцев и экспериментальных животных были одобрены Локальным комитетом по этике при ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова (протокол № 6 от 04.03.2023).

## Authors / Об авторах

**Aleksandra A. Nikonova**, Cand. Sci. (Biol.) / **Никонова Александра Александровна**, канд. биол. наук  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9610-0935>

**Alina S. Poroshina** / **Порошина Алина Сергеевна**  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0400-2201>

**Tatiana G. Samartseva** / **Самарцева Татьяна Геннадьевна**  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

**Anastasia G. Samartseva** / **Самарцева Анастасия Геннадьевна**  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-3859-5909>

**Anastasia D. Adelfinskaya** / **Адельфинская Анастасия Дмитриевна**  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2501-2847>

**Bana Tahhan** / **Тахан Бана**  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9604-0139>

**Nadezda N. Shershakova**, Cand. Sci. (Biol.) / **Шершакова Надежда Николаевна**, канд. биол. наук  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6444-6499>

**Musa R. Khaitov**, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. RAS / **Хаитов Муса Рахимович**, д-р мед. наук, проф., академик РАН  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-9640>

**Alexey S. Oksanich**, Cand. Sci. (Biol.) / **Оксанич Алексей Сергеевич**, канд. биол. наук  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>






**George M. Ignatyev**, Dr. Sci. (Med.), Prof. / **Игнатъев Георгий Михайлович**, д-р мед. наук, проф.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

**Vitaly V. Zverev**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Acad. RAS / **Зверев Виталий Васильевич**, д-р биол. наук, проф., академик РАН  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

Received October 13, 2025  
Revised December 18, 2025  
Accepted February 26, 2026

Поступила 13.10.2025  
После доработки 18.12.2025  
Принята к публикации 26.02.2026

## scFv-фрагменты рекомбинантных антител к вирусу гриппа: получение и характеристика функциональной активности

М.А. Плотникова<sup>1</sup> , В.А. Топорова<sup>1,2</sup> , Е.А. Романовская-Романько<sup>1</sup> ,  
А.А. Шалджян<sup>1</sup> , С.А. Клотченко<sup>1,✉</sup> 

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Профессора Попова, д. 15/17, Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, 117997, Российская Федерация

✉ Клотченко Сергей Анатольевич; [fosfatik@mail.ru](mailto:fosfatik@mail.ru); [sergey.klotchenko@influenza.spb.ru](mailto:sergey.klotchenko@influenza.spb.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Пассивная иммунотерапия с использованием антител широкого спектра действия является перспективным направлением разработки новых лекарственных средств для борьбы с гриппом. Однако технологии получения, очистки и хранения рекомбинантных антител, пригодных для клинического применения, по-прежнему сопряжены со значительными трудностями. scFv-фрагменты антител (одноцепочечные вариабельные фрагменты) являются более простой, надежной и гибкой альтернативой полноразмерным аналогам антител.

**ЦЕЛЬ.** Разработка экспрессионных конструкций для синтеза scFv-фрагментов рекомбинантных антител к вирусу гриппа А и В, получение белковых препаратов scFv и оценка их функциональной активности *in vitro*.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Экспрессионные конструкции, кодирующие scFv-фрагменты антител, получали методом ПЦР с использованием перекрывающихся праймеров и методами генной инженерии. Построение 3D-моделей разработанных scFv-фрагментов проводили по первичной аминокислотной последовательности на сервере AlfaFold. Нарработку антител проводили в клеточной линии НЕК293 в ходе транзientной экспрессии. Препараты антител очищали из культуральной жидкости методом металл-аффинной хроматографии. Иммуноферментный анализ (ИФА) использовали для изучения вирус-специфической активности антител. Вируснейтрализующую активность антител изучали на монослойной культуре клеток MDCK по цитопатическому действию и регистрировали в реакции гемагглютинации.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** На основе рекомбинантных антител, специфичных к вирусу гриппа А и В, был осуществлен дизайн и предсказана пространственная структура scFv-фрагментов, получены три генетические конструкции для экспрессии белков scFv в культуре эукариотических клеток. scFv-фрагменты были наработаны и очищены методом аффинной хроматографии с никелевым сорбентом в количестве не менее 0,5 мг и концентрации около 1 мг/мл каждого. Методом электрофореза белков в полиакриламидном геле было подтверждено соответствие выделенных scFv-фрагментов ожидаемому значению молекулярной массы – около 28 кДа. Методом ИФА было показано специфическое связывание scFv-фрагментов с различными штаммами вируса гриппа А и В. Установлено, что 50% вируснейтрализующая доза scFv-фрагмента антитела к поверхностному гемагглютинину вируса гриппа (170 нг/мл) сопоставима с нейтрализующей дозой для исходного полноразмерного антитела (179 нг/мл).

**ВЫВОДЫ.** Разработан дизайн и получены scFv-фрагменты двух антител, одного – обладающего широкой нейтрализующей активностью против вируса гриппа А, другого – специфичностью в отношении вируса гриппа В. Благодаря малым размерам scFv-фрагменты могут эффективно проникать через слизистые оболочки при интраназальном введении. Указанное свойство определяет потенциал использования scFv-фрагментов в экстренной профилактике и ранней терапии ОРВИ. Перспективным направлением для усиления нейтрализующей активности является создание биспецифических scFv-фрагментов, способных одновременно нацеливаться на два вирусных эпитопа.

**Ключевые слова:** рекомбинантные антитела; антитела широкого спектра действия; scFv-фрагменты; вирус гриппа; противовирусные препараты; пассивная иммунотерапия; вируснейтрализующая активность

**Для цитирования:** Плотникова М.А., Топорова В.А., Романовская-Романько Е.А., Шалджян А.А., Клотченко С.А. scFv-фрагменты рекомбинантных антител к вирусу гриппа: получение и характеристика функциональной активности. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2026;26(1):54–66. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-728>

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, соглашение № 24-25-00488. Название проекта: «Изучение противовирусного потенциала внутриклеточных scFv антител к гриппу» (руководитель – С.А. Клотченко). <https://rscf.ru/project/24-25-00488/>

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Production and functional activity of scFv fragments obtained from recombinant antibodies against influenza virus

Marina A. Plotnikova<sup>1</sup> , Viktoriya A. Toporova<sup>1,2</sup> , Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko<sup>1</sup> , Aram A. Shaldzhyan<sup>1</sup> , Sergey A. Klotchenko<sup>1</sup> ✉ 

<sup>1</sup> Smorodintsev Research Institute of Influenza, 15/17 Prof. Popov St., St. Petersburg 197022, Russian Federation

<sup>2</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, GSP-7, 16/10 Miklukho-Maklay St., Moscow 117997, Russian Federation

✉ Sergey A. Klotchenko; [fosfatik@mail.ru](mailto:fosfatik@mail.ru); [sergey.klotchenko@influenza.spb.ru](mailto:sergey.klotchenko@influenza.spb.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Passive immunotherapy using broad-spectrum antibodies is a promising development vector of new drugs against influenza. However, production process, purification, and storage of clinically suitable recombinant antibodies still face significant challenges. Antibody scFv (single-chain variable fragments) represent a more reliable, flexible, and simpler alternative to full-length antibody analogues.

**AIM.** This study aimed to develop expression constructs used to synthesize scFv fragments of recombinant antibodies against influenza A and B viruses, produce scFv protein preparations, and evaluate their *in vitro* functional activity.

**MATERIALS AND METHODS.** Expression constructs encoding antibody scFv fragments were obtained by PCR using overlapping primers and genetic engineering methods. 3D models of the developed scFv fragments were constructed from the primary amino acid sequence using AlfaFold Server. Antibodies were produced in a HEK293 cell line via transient expression. Antibody preparations were purified from the culture fluid by metal affinity chromatography. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to study the virus-specific activity of the antibodies. Virus neutralising activity was studied in Madine-Darbi canine kidney (MDCK) cell monolayer culture based on cytopathic effect and recorded in a haemagglutination assay.

**RESULTS.** Based on recombinant antibodies specific to influenza A and B viruses, configuration of scFv fragments was designed and predicted, and three genetic constructs were obtained for

expression of scFv proteins in a eukaryotic cell culture. The scFv fragments were produced and purified by affinity chromatography using Ni sorbent (no less than 0.5 mg) at a concentration of about 1 mg/mL of each fragment. Protein polyacrylamide gel electrophoresis confirmed that the isolated scFv fragments matched the expected size of approximately 28 kDa. ELISA demonstrated specific binding of scFv fragments to various influenza A and B strains. It was established that a 50% virus neutralising dose of the scFv antibody fragment against the influenza virus surface haemagglutinin (170 ng/mL) is comparable to that of the original full-length antibody (179 ng/mL).

**CONCLUSIONS.** The scFv fragments have been designed and obtained for two antibodies; the one has broad neutralising activity against influenza A virus, the other is specific for influenza B virus. Due to their small size, scFv fragments can effectively penetrate mucous membranes upon intranasal administration. This makes scFv fragments potentially useful in the emergency prophylaxis and early therapy of acute respiratory viral infections. A promising decision for enhanced neutralising activity is to create bispecific scFv fragments capable of simultaneously targeting two viral epitopes.

**Keywords:** recombinant antibodies; broad-spectrum antibodies; scFv fragments; influenza virus; antiviral drugs; passive immunotherapy; virus neutralizing activity

**For citation:** Plotnikova M.A., Toporova V.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Shaldzhyan A.A., Klotchenko S.A. Production and functional activity of scFv fragments obtained from recombinant antibodies against influenza virus. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2026;26(1):54–66. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-728>

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation, Agreement No. 24-25-00488, project title: Study of the Antiviral Potential of Intracellular scFv Antibodies against Influenza (Principal investigator – Sergey A. Klotchenko). <https://rscf.ru/project/24-25-00488/>

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа ежегодно вызывают до 70% случаев сезонных респираторных инфекций и имеют крайне высокий пандемический потенциал [1]. Современная стратегия противодействия гриппу в значительной степени опирается на вакцинопрофилактику. Формирующиеся в ответ на вакцинный или инфекционный штамм антитела могут обеспечить полную иммунную защиту от повторного заражения тем же (гомосубтипичным) штаммом вируса гриппа [2]. Однако эволюционно выработанные вирусом гриппа механизмы, такие как высокая антигенная изменчивость и реассортация геномных сегментов, существенно затрудняют предсказание циркуляции эпидемически значимых штаммов гриппа, а ошибки в выборе вакцинных штаммов приводят к значительному снижению профилактической эффективности [3]. Пассивная иммунотерапия с использованием моноклональных антител широкого спектра действия является альтернативным подходом в борьбе с инфекциями, вызванными вирусами гриппа.

Модульная структура антител дает возможность создавать более компактные функциональные фрагменты, такие как антигенсвязывающие фрагменты (fragment antigen binding, Fab), одноцепочечные переменные фрагменты (single chain variable fragments, scFv), однодоменные антитела, а также кристаллизуемые фрагменты антитела (fragment crystallizable, Fc) [4].

Молекулы scFv представляют собой химерные рекомбинантные белки, состоящие из переменных участков тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей полноразмерного антитела, которые соединены друг с другом гибким пептидным линкером [5, 6]. Переменные участки VH и VL, локализованные совместно, формируют переменный фрагмент, который непосредственно участвует в связывании антигена. scFv-фрагменты демонстрируют аффинность связывания, сравнимую с исходными полноразмерными антителами – иммуноглобулинами класса G (IgG). Производство scFv-фрагментов менее затратно благодаря компактным размерам; scFv-фрагменты лучше проникают в ткани и органы и достигают стерически скрытых и конформационно сложных эпитопов антигена [4]. scFv-фрагменты не содержат константные области Fc, которые есть в полноразмерных молекулах антител, поэтому scFv-фрагменты характеризуются сниженной иммуногенностью из-за отсутствия эффекторных функций [4, 7].

Для выделения scFv-фрагментов из культурального супернатанта не подходит стандартный для хроматографической очистки иммуноглобулинов Fc-рецепторный белок G *Streptococcus pyogenes*. Очистку и иммобилизацию scFv-фрагментов осуществляют с использованием белка L (взаимодействует с переменной областью легких к-цепей), а в случае наличия в scFv-фрагменте человеческого домена VH3 –

с использованием белка А [8]. Наиболее распространенным подходом при конструировании является добавление к С-концу молекулы scFv последовательности из шести гистидинов (6×His-tag) для дальнейшей очистки методом металл-аффинной хроматографии [9, 10].

Использование scFv-фрагментов антител для лечения и профилактики острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) перспективно в силу ряда ключевых преимуществ. Малый размер scFv-фрагментов способствует лучшему проникновению через слизистые оболочки дыхательных путей при интраназальном введении препарата. Низкая иммуногенность и быстрое выведение из организма делают scFv-фрагменты идеальными кандидатными препаратами для экстренной профилактики во время эпидемий и терапии ОРВИ на ранних стадиях.

Наше научное исследование посвящено конструированию и созданию молекулярно-биологическими методами панели scFv-фрагментов высокоаффинных моноклональных антител, связывающих гемагглютинин (НА) и нуклеопротеин (NP) вируса гриппа А и В. Первый scFv-фрагмент был создан на основе человеческого иммуноглобулина G (IgG) FI6, который характеризуется широкой нейтрализующей активностью против штаммов вируса гриппа А (ВГА), относящихся к первой и второй филогенетическим группам [11]. Как установлено ранее, антитело FI6 взаимодействует с остатками пеп-

тида слияния и гидрофобной областью спирали НА ВГА, но не связывается с вирусом гриппа В (ВГВ) [11–13]. Другие два белковых варианта scFv были разработаны на основе моноклональных IgG мыши (клон 2/3), впервые полученных в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России при инфицировании экспериментальных животных ВГВ. IgG 2/3 специфически связывают головной домен NP Ямагатской и Викторианской антигенных линий ВГВ, но не являются нейтрализующими и широко используются в диагностических тест-системах [14].

Цель работы – разработка экспрессионных конструкций для синтеза scFv-фрагментов рекомбинантных антител к вирусу гриппа А и В, получение белковых препаратов scFv и оценка их функциональной активности *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Полимеразная цепная реакция

ПЦР с перекрывающимися геноспецифическими праймерами проводили с использованием высокоточной полимеразы Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США) и специально разработанных четырех пар специфических праймеров (табл. 1), синтезированных ЗАО «Евроген» (Россия) в три этапа: получение первичных фрагментов, отжиг первичных фрагментов, достраивание до полноразмерного фрагмента и финальная амплификация [15]. Второй и третий этапы ПЦР

Таблица 1. Последовательности разработанных праймеров для получения scFv-фрагментов  
Table 1. Sequences of the designed primers for amplification of scFv fragments

Праймеры <i>Primers</i>	Последовательности праймеров (5'→3') <i>Primer sequences (5'→3')</i>	Расчетная Tm, °C <i>Calculated melting temperature, °C</i>	Длина ПЦР-фрагмента, п.н. <i>PCR-restriction fragment length, base pairs</i>
F-scFv-SP-23-Clal	TGCGC <b>ATCGAT</b> GCCACCATGGACTTCCAGGTG*	68,23	467
R-scFv-in-23	<u>GGAGCCGCCGCCGAGAACCAACCACCAGAACCAACCAC-</u> CACCTTTCAGCTCCAGC**	80,88	
F-scFv-in-23	<u>GGCGGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCAGGTTCAGCTGC</u>	79,77	416
R-scFv-23-NotI	TTAG <b>CGGGCCG</b> CTAATGATGATGATGATGATGGCTCGAGACG	70,37	
F-scFv-SP-FI6-Clal	ATT <b>ATCGAT</b> GCCACCATGAAGTCACAGACCCAGGCT	64,40	453
R-scFv-in-FI6	<u>GGAGCCGCCGCCGAGAACCAACCACCAGAACCAACCAC-</u> CACCTTTCAGCTCCAGC**	79,22	
F-scFv-in-FI6	<u>GGCGGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCAGGTCAGCTG</u>	80,13	449
R-scFv-FI6-NotI	TTAG <b>CGGGCCG</b> CTAATGATGATGATGATGATGGGAGCTCACG	70,37	

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

Примечание. п.н. – пары нуклеотидов, Tm – температура плавления.

\* Жирным шрифтом выделены последовательности узнавания соответствующих эндонуклеаз рестрикции.

\*\* Участки перекрывания первичных scFv-фрагментов выделены подчеркиванием.

Note. Tm, melting temperature.

\* Restriction endonuclease recognition sites are highlighted in bold.

\*\* Overlapping regions between primary scFv fragments are underlined.

с перекрывающимися праймерами проводили с использованием в качестве матрицы 20 нг первичных продуктов и 2 мкМ наружных прямого и обратного праймеров со следующими установками амплификатора Gentier 96E (Tianlong, Китай): 1) денатурация – 98 °С, 30 с; 2) 9 циклов: отжиг – 98 °С, 40 с; элонгация – 72 °С с понижением температуры на 0,5 °С на каждом следующем цикле, 25 с; 3) 15 циклов: денатурация – 98 °С, 15 с; отжиг – 65 °С, 15 с; элонгация – 72 °С, 25 с.

### **Клонирование**

ScFv-фрагменты обрабатывали рестриктазами *Clal* и *NotI* (Сибэнзим, Россия) для клонирования в экспрессионный вектор pIRESneo3 (Clontech, США). Продукты реакции разделяли в 1% агарозном геле, содержащем 1x TAE-буфер (ЗАО «Евроген», Россия). Для выделения фрагментов нужной длины из геля применяли набор Cleanup S-Car (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Аналогичным образом обрабатывали рестриктазами вектор pIRESneo3 (Clontech, США), очищая его из реакционной смеси с использованием набора Cleanup S-Car. Затем проводили лигирование очищенных фрагментов и вектора в молярном соотношении 3:1 лигазой фага T4 (T4 DNA Ligase, Thermo Fisher Scientific, США) в объеме 20 мкл в течение 30 мин при 22 °С. Далее лигазную смесь сразу использовали для трансформации химически компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli*, штамм HB101, по методу H. Inoue с соавт. [16].

### **Молекулярное моделирование**

Построение 3D-моделей разработанных scFv-фрагментов проводили по первичной аминокислотной последовательности (транслированной из секвенограммы) на сервере AlphaFold Server 3 [17]. AlphaFold напрямую предсказывает локальную структуру белка (геометрию связей тяжелых атомов), используя в качестве входных данных первичную аминокислотную последовательность и известные структуры белков-гомологов. Моделирование проводили для стандартных шаблонов MSA (Multiple-Sequence Alignment), установленных по умолчанию, задавая в качестве типа объекта «protein»; аминокислотная последовательность белка была введена без сигнального пептида.

### **Получение scFv-фрагментов в эукариотических клеточных линиях**

Клетки линии HEK293 культивировали в среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением 10%

эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Для проведения трансфекции клетки засеивали в количестве 25×10<sup>6</sup> клеток в культуральные флаконы площадью 175 см<sup>2</sup> (Jet BioFl, Китай) и на следующие сутки трансфицировали реагентом GenJect-39 (Molecta, Россия) согласно инструкции производителя из расчета 40 мкг плазмиды на один культуральный флакон и с использованием соотношения «ДНК:трансфекционный агент», равного 1:1 (масса/объем, мкг/мкл). Клетки после трансфекции культивировали в течение 12 сут, поддерживая концентрацию глюкозы не менее 4 г/л.

**Уровень глюкозы** в культуральной среде измеряли с использованием медицинского глюкометра Accu-Chek Active (Roche Diabetes Care, Германия) с соответствующими тест-полосками.

### **Получение стабильных клеток-продуцентов**

Для получения стабильных продуцентов рекомбинантных белков использовали перевиваемую клеточную линию ExpiHEK293 (Thermo Fisher Scientific, США) и ростовую среду DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением сыворотки крупного рогатого скота до 5% (Gibco, США). Трансфекцию суточного монослоя клеток (~0,5×10<sup>6</sup> клеток в лунке) проводили 1 мкг соответствующей генетической конструкции на основе вектора pIRESneo3 (Clontech, США) с использованием GenJect-39 (Molecta, Россия). Селекцию пулов-продуцентов проводили в течение 2 нед. с использованием антибиотика G418 (Gibco, США), вносимого в культуральную среду до конечной концентрации 150 мкг/мл. Продукцию scFv-фрагментов в супернатантах клеток оценивали каждые 3–5 сут методом иммуноферментного анализа (ИФА). Отбор стабильных клонов-продуцентов проводили методом предельных разведений, рассеивая пул стабильных продуцентов в лунки 96-луночного планшета из расчета одна клетка на лунку. Подсчет клеток проводили в автоматическом счетчике клеток TC-10 (Bio-Rad, США). Клоны, показавшие наибольшую продуктивность и жизнеспособность, были размножены и депонированы в Коллекцию ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

### **Хроматографическая очистка**

Очистку рекомбинантных антител из культуральной среды проводили с использованием метода металл-аффинной хроматографии на системе ÄKTA pure (Cytiva, Швеция) с колонкой Polac MC60-Ni Excel объемом 1 мл (Seraph, Китай). Элюцию scFv-фрагментов выполняли 15 мл (15 объемов

колонки) 100% элюирующего буфера (50 мМ трис-HCl, 500 мМ натрия хлорид, 500 мМ имидазол, pH 8,0) при скорости потока 5 мл/мин. Контроль элюции проводили по поглощению раствора при длине волны 280 нм. На этапе элюции на автоматическом коллекторе отбирали фракцию, соответствующую пику оптической плотности >0,05 AU. Далее материал переводили в фосфатно-солевой буфер обезсоливанием при помощи картриджа Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 (Bio-Rad, США) объемом 10 мл согласно инструкции производителя. Полученный препарат фильтровали через шприцевой фильтр Sartorius (Германия) с размером пор 0,45 мкм. Очищенные препараты scFv концентрировали с использованием центрифужных концентраторов JetSpin 5 kDa (Jet Biofil, Китай) и стерилизовали фильтрацией через PES-мембрану с размером пор 0,22 мкм (Jet Biofil, Китай).

**Концентрацию общего белка** измеряли на флуориметре Qubit с использованием набора Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

#### Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ)

Электрофорез белков в ПААГ выполняли по методике Лэммли [18] в восстанавливающих условиях с добавлением β-меркаптоэтанола. Применяли градиентный гель Any kD с 15 лунками (Кат. № 4568126, Bio-Rad, США). Образцы перед загрузкой в лунки смешивали с 4х буфером для образцов (Laemmli sample buffer) и денатурировали при 95 °C в течение 10 мин в термостате «Гном» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Разделение белков осуществляли при постоянном токе 25 мА на гель в течение 45 мин в вертикальной камере Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). Гель окраши-

вали коллоидным раствором Кумасси по методу G. Candiano с соавт. [19]. Визуализацию окрашенного геля проводили на системе документирования Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, США).

#### Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ выполняли с использованием 96-луночных планшетов Microlopon High Binding (Greiner Bio-One, Германия) и термостатической емкости MB100-4A (Allsheng, Китай). Для работы использовали вирусы гриппа из Коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Для иммобилизации в качестве антигена были подготовлены вирусные панели (табл. 2): вирусы гриппа А и В выращивали в 10-дневных куриных эмбрионах, очищали в градиенте сахарозы и далее хранили при -80 °C в аликвотах, содержащих 2–5 мг/мл общего белка. Вирусы сорбировали в концентрации 2–5 мкг на 100 мкл на поверхности лунок при 4 °C в течение 16 ч. Для блокирования неспецифического связывания использовали 5% раствор обезжиренного молока (Blotting-Grade Blocker, Кат. № 1706404, Bio-Rad, США) в фосфатно-солевом буфере pH 7,4 (ООО «ПанЭко», Россия) с 0,05% Твин-20 при 37 °C в течение 1 ч. Образцы scFv в концентрации 200 нг/мл инкубировали при 37 °C в течение 2 ч, затем добавляли конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к последовательности 6×His-tag (HyTest, Россия) в разведении 1:2000 (рекомендовано производителем) и инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. Для выявления референсного образца IgG-F16 использовали антитела Goat Anti-Human IgG H&L, конъюгированные с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США). После стандартной детекции с использованием тетраметилбензидина (ООО «Хема», Россия) и 1 Н серной кислоты измеряли оптическую плотность при длинах волн 450 и 655 нм на микропланшетном спектрофотометре Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, США). Статистический анализ первичных данных проводили в программных пакетах Microsoft Office Excel 2010 и GraphPad Prism 8.

#### Оценка вируснейтрализующей активности

Образцы объемом 50 мкл, содержащие scFv-фрагменты в концентрациях от 0,001 до 10 мкг/мл, смешивали с равным объемом образца, содержащего 100 ТЦД<sub>50</sub><sup>1</sup> вируса гриппа. Полученную смесь в объеме 100 мкл инкубировали при 37 °C в течение 1 ч, затем наносили на монослой клеток MDCK<sup>2</sup>, предварительно промытый

Таблица 2. Штаммы вируса гриппа А и В, используемые в работе

Table 2. Influenza A and B virus strains used in the study

Номер Number	Штамм Strain	Подтип вируса Virus subtype
1	A/Brisbane/02/18	A/H1N1pdm
2	A/California/07/09	A/H1N1pdm
3	A/Texas/50/12	A/H3N2
4	A/СПб-НИИГ-310/23 A/Spb-NIIG-310/23	A/H3N2
5	A/California/МА	A/H2N2
6	B/Phuket/3073/13	B/Yamagata

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

<sup>1</sup> Тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя.

<sup>2</sup> Madin-Darby canine kidney cells, клетки почек собаки Мадина-Дарби.

фосфатно-солевым буфером pH 7,2, в 96-луночных планшетах для клеточных культур (NUNC, Дания). Планшеты помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, и инкубировали в течение 3 сут. Цитопатическое действие вирусов гриппа анализировали визуально и регистрировали в реакции гемагглютинации по стандартной методике [20]. Показатель IC<sub>50</sub> (полумаксимальная ингибирующая концентрация) рассчитывали по результатам построения 4-параметрической кривой «доза-эффект» с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 на основании трех независимых повторов. Статистический анализ первичных данных проводили в программных пакетах Microsoft Office Excel 2010 и GraphPad Prism 8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Молекулярный дизайн и получение экспрессионных конструкций для scFv-фрагментов

Схематическое изображение предложенного нами дизайна scFv-фрагментов показано на рисунках 1А и 1В. N-конец scFv-фрагмента содержал сигнальный пептид для секреции белка во внеклеточное пространство. Далее к C-концу VL-участка IgG через пространственный линкер в направлении от N- к C-концу был добавлен VH-участок антитела, содержащий на C-конце последовательность 6×His-tag. Две линкерные последовательности, одна из которых состоит из тетрамера G<sub>4</sub>S ((G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>), а другая – из гексамера G<sub>4</sub>S ((G<sub>4</sub>S)<sub>6</sub>), были предложены для scFv-2/3; для scFv-F16 в качестве линкера был использован только один олигопептид (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>. В качестве сигнального пептида использована последовательность L1 MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC, обеспечивающая высокопродуктивную сборку рекомбинантных антител в эукариотических системах на основе клеточных линий CHO<sup>3</sup> и HEK<sup>4</sup> [21, 22].

Синтез последовательностей scFv был осуществлен с использованием ПЦР с перекрывающимися праймерами (табл. 1) в несколько стадий (рис. 1В). В качестве ДНК-матрицы использовали плазмидные конструкции, кодирующие тяжелую и легкую цепи антител 2/3 и F16, разработанные нами ранее для получения рекомбинантных полноразмерных антител. На первой стадии была проведена независимая амплификация переменных участков легкой и тяжелой цепей, при этом 3'-конец ПЦР-продукта легкой цепи перекрывался с 5'-концом ПЦР-продукта тяжелой цепи [23, 24]. Как показано на рисунке 1С, длины

полученных переменных последовательностей соответствовали ожидаемым (показано для антитела F16). Фрагменты выделяли из геля и использовали в качестве матрицы (в количестве 20 нг) во второй стадии ПЦР, затем добавляли наружные праймеры, содержащие сайты рестрикции *ClaI* и *NotI*. Амплификация всех фрагментов осуществлялась высокоточной полимеразой Phusion™.

Полученные scFv-фрагменты очищали из геля (рис. 1С) и клонировали методом рестрикции-лигирования (по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *ClaI* и *NotI*) в векторе pIRESneo3 (Clontech, США). Полученные плазмидные конструкции были накоплены, очищены, в том числе от бактериального эндотоксина, и секвенированы методом Сэнгера в ЗАО «Евроген» (Россия). Нуклеотидная и транскрибированная аминокислотные первичные последовательности scFv-фрагментов полностью соответствовали ожидаемой структуре.

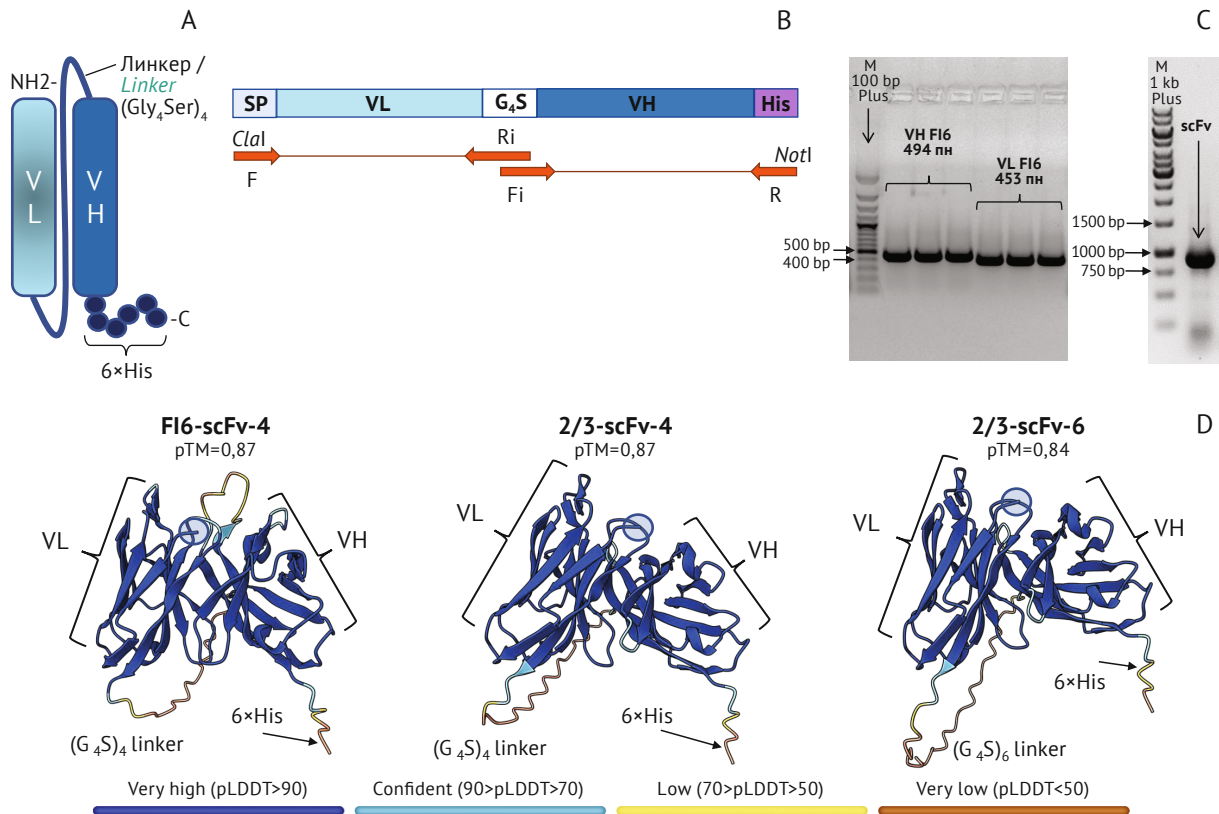
С использованием программного обеспечения AlphaFold 3 [17, 25] была предсказана пространственная структура всех трех разработанных scFv-фрагментов (рис. 1D). Согласно полученным нами результатам (рис. 1D), вторичная структура VL и VH участков в структуре scFv-фрагментов представляет собой бета-складчатые тяжи (pLDDT>90) подобно структуре, описанной для иммуноглобулинов [26]. Наименьшее качество прогнозирования (pLDDT<50) в структурах scFv-фрагментов было показано для сателлитных инженерных структур, особенно для линкерных областей, состоящих из аминокислотных остатков глицина и серина (рис. 1D). Таким образом, представлены модели 3D-структуры scFv-фрагментов. Наиболее вероятная доменная организация созданного химерного scFv-F16 белка в целом отражает экспериментальные структуры, описанные для исходного полноразмерного антитела F16 (PDB 3ZTN) [11].

### Получение и характеристика белков scFv

Полученные плазмидные конструкции на основе pIRESneo3 (Clontech, США) были использованы для трансфекции клеток HEK293. Для определения продолжительности продукции, обеспечивающей максимальный выход рекомбинантных белков при временной трансфекции, исследовали кинетику накопления scFv-фрагментов в культуральной жидкости. Устойчивый прирост наблюдался в течение

<sup>3</sup> Chinese hamster ovary cells, клетки яичника китайского хомячка.

<sup>4</sup> Human embryonic kidney cells, клетки эмбриональной почки человека.



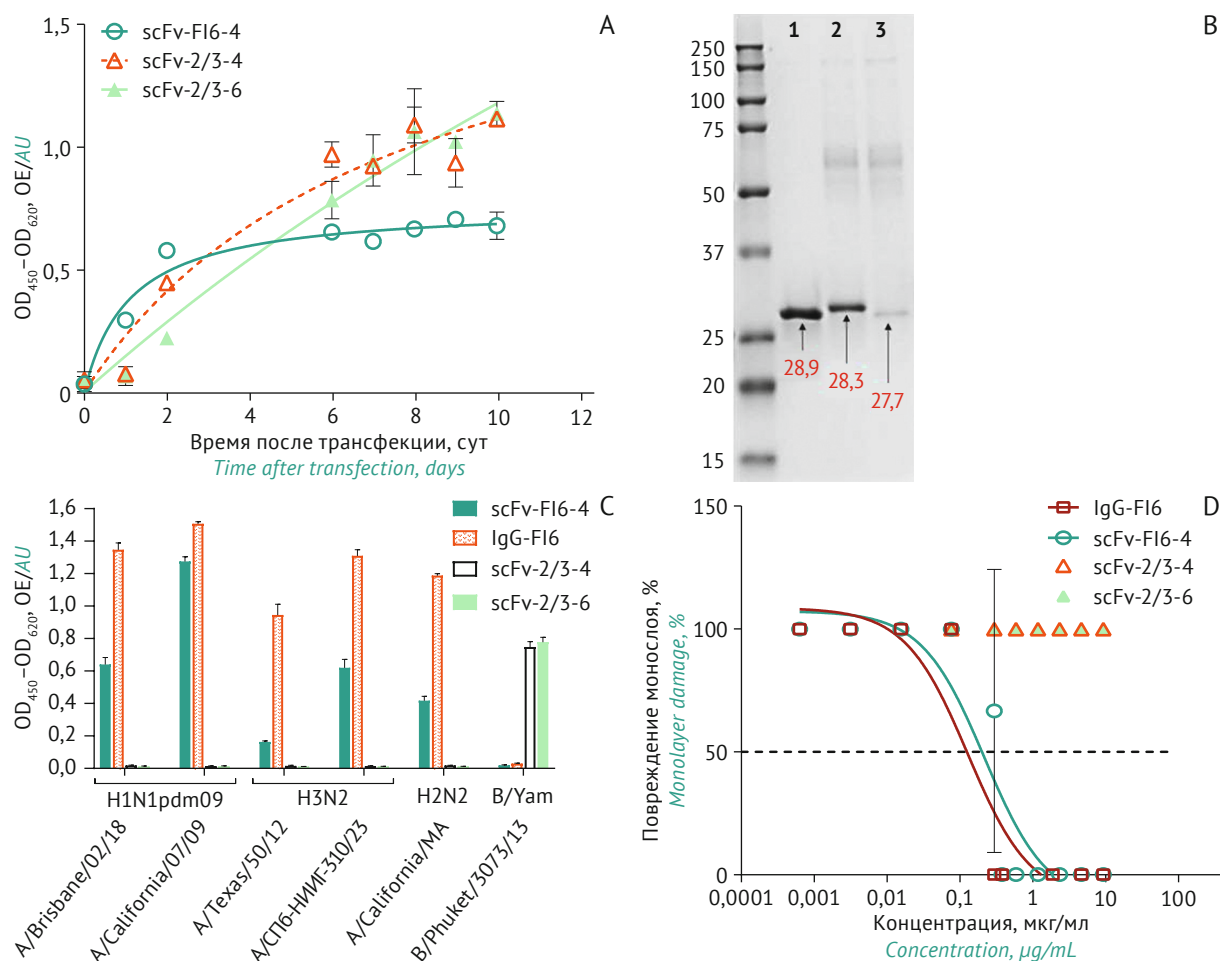
**Рис. 1.** Молекулярный дизайн и получение scFv-фрагментов рекомбинантных антител к вирусу гриппа А и В. А – схема принципиального дизайна белковой молекулы scFv (секретируемая форма не содержит сигнального пептида). VL – варибельный участок легкой цепи, VH – варибельный участок тяжелой цепи, 6×His – последовательность, состоящая из шести гистидинов. В – схема нуклеотидной последовательности для получения scFv-фрагмента методом ПЦР с перекрывающимися праймерами. F/R – прямой и обратный наружные праймеры; Fi/Ri – внутренние перекрывающиеся праймеры. С – электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, кодирующих VL и VH фрагменты (показано слева для scFv-FI6). Амплифицированный scFv-фрагмент для клонирования в вектор pIRESneo3 (справа). М 100 бп и М 1 kb Plus – маркеры молекулярного веса (Fermentas, Латвия); бп – пары оснований. D – молекулярное моделирование разработанных белковых молекул scFv-FI6-4 на основе антитела к гемагглютинуину вируса гриппа А с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>; scFv-2/3-4 и scFv-2/3-6 – на основе антитела к нуклеопротеину вируса гриппа В с линкерами (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> и (G<sub>4</sub>S)<sub>6</sub>, соответственно. pLDDT (local distance difference test) – оценка достоверности для каждого атома по шкале от 0 до 100 (показана внизу рисунка). pTM – рассчитанный показатель прогнозируемого моделирования шаблона; значение pTM>0,5 указывает на то, что общая прогнозируемая структура комплекса может быть похожа на истинную структуру.

**Fig. 1.** Molecular design and obtaining scFv fragments for recombinant antibodies against influenza A and B viruses. A, schematic design of scFv protein molecule (the secreted form lacks a signal peptide). VL, variable light chain domain; VH, variable heavy chain domain; 6×His, hexahistidine tag. B, nucleotide sequence scheme for obtaining scFv fragment by overlap extension PCR. F/R, forward/reverse outer primers; Fi/Ri, forward inner/reverse inner overlapping primers. C, electrophoretic separation of PCR products (shown for scFv-FI6) encoding VL and VH fragments (left), and the amplified scFv fragment for cloning into pIRESneo3 vector (right); M 100 bp and M 1 kb Plus, corresponding molecular weight markers (Fermentas, Latvia); bp, base pairs. D, molecular modelling of the designed scFv-FI6-4 protein molecules (based on an anti-HA IAV antibody with a (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> linker); scFv-2/3-4 and scFv-2/3-6 (based on an anti-NP IBV antibody with (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> and (G<sub>4</sub>S)<sub>6</sub> linkers, respectively). pLDDT (local distance difference test) – per-residue confidence score on a scale from 0 to 100 (shown at the bottom as a color scale). pTM, predicted Template Modeling score, is indicated below the protein name. pTM>0.5 suggests that the overall predicted structure of the complex may be similar to the true structure.

6 сут для scFv-FI6-4 и в течение примерно 8 сут для обоих фрагментов scFv-2/3 (рис. 2А). Были получены и сохранены стабильные линии клеток-продуцентов фрагментов scFv-FI6-4, scFv-2/3-4 и scFv-2/3-6 с использованием антибиотика G418 на основе клеточной культуры ExpiNEK293. Был проведен первый этап

селекции клеток-продуцентов, в результате которого удалось депонировать пул постоянных жизнеспособных продуцентов с первичной продуктивностью не менее 5 мкг/мл (результаты не представлены).

Для выделения и очистки scFv-фрагментов проводили транзientную продукцию в течение 10 сут.



**Рис. 2.** Получение и характеристика белковых scFv-фрагментов рекомбинантных антител к вирусу гриппа А и В.

А – динамика накопления scFv-фрагментов в супернатантах трансфицированных клеток. Оценку уровня продукции проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА), по оси ординат показаны нормированные значения оптической плотности ввиду отсутствия референс-образца для построения калибровочной кривой. Точками показаны средние значения оптической плотности, вертикальными отрезками – стандартные отклонения для трех биологических повторов. OD – оптическая плотность.

В – электрофореграмма экспериментальных образцов scFv в восстанавливающих условиях: scFv-FI6-SP4 (1), scFv-2/3-SP6 (2), scFv-2/3-SP4 (3). Стрелками указаны полосы, соответствующие scFv-фрагментам; красные цифры – ожидаемые молекулярные массы scFv (кДа); крайняя дорожка слева – маркер молекулярных масс Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards (Bio-Rad, USA).

С – оценка специфического связывания полученных препаратов scFv и референсного препарата IgG-FI6 с вирусами гриппа методом ИФА. По оси абсцисс указаны названия сорбированных штаммов вирусов, сгруппированных по подтипам: вирус гриппа А (H1N1pdm, H3N2, H2N2); для вируса гриппа В указана генетическая линия вируса гриппа В/Yamagata, к которой относится используемый штамм.

Д – нейтрализующая активность полученного scFv-FI6-SP4 и исходного IgG-FI6 препаратов в отношении штамма вируса гриппа А/California/07/09 (H1N1pdm09). Определение титра нейтрализующих антител было выполнено в трех повторах, для каждой точки на графике представлено среднее значение процента повреждения ± стандартное отклонение.

**Fig. 2.** Preparation and parameters of scFv protein fragments of recombinant antibodies against influenza A and B viruses.

A, dynamics of scFv fragment accumulation in the supernatants of transfected cells. The production level was assessed by ELISA. The ordinate axis shows normalised optical density values due to the lack of a reference sample for constructing a calibration curve. The dots represent the mean optical density values, the vertical bars represent standard deviations for three biological replicates. OD, optical density.

B, electrophoregram of experimental scFv samples under reducing conditions. Band designations: scFv-FI6-SP4 (1), scFv-2/3-SP6 (2), scFv-2/3-SP4 (3). The arrows indicate bands corresponding to scFv fragments; the expected molecular masses of the scFv (kDa) are labeled in red below. Molecular weight marker Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad, USA) is shown in the left band.

C, assessment of the specific binding of the obtained scFv preparations and the reference IgG-FI6 preparation to influenza viruses by ELISA. The names of the adsorbed virus strains are indicated at the bottom, grouped by subtype: for influenza A virus (H1N1pdm, H3N2, H2N2); for influenza B virus, the genetic lineage of the influenza virus B/Yamagata is indicated, where the used strain belongs.

D, neutralising activity of the obtained scFv-FI6-SP4 preparation and the original IgG-FI6 against the A/California/07/09 (H1N1pdm09) strain. The neutralisation antibody titer was determined in triplicate; for each data point on the graph, the mean percentage of damage value ± standard deviation is presented.

Далее препараты scFv-фрагментов, полученные в результате хроматографической очистки, анализировали методом электрофореза белков в ПААГ в восстанавливающих условиях (рис. 2B). Молекулярные массы полученных scFv-фрагментов соответствуют ожидаемым значениям, что следует из электрофореграммы.

Способность полученных нами образцов scFv к специфическому связыванию с HA ВГА и NP ВГВ изучали методом ИФА (рис. 2C). Для этого в качестве сорбирующих лигандов использовали панель ВГА, содержащих различные подтипы поверхностных HA, и ВГВ (табл. 2). В экспериментах использовали несколько штаммов ВГА: H1N1pdm09 и H3N2, наиболее широко распространенные в человеческой популяции, и ВГА подтипа H2N2; в качестве ВГВ использовали штамм V/Phuket/3073/13, относящийся к Ямагатской генетической линии.

Согласно полученным результатам, scFv-FI6-4 специфически связывал все штаммы ВГА, однако уровень детектируемого сигнала несколько варьировал. Предположительно, scFv-FI6 имеет наибольшее сродство к ВГА подтипа H1N1pdm, что согласуется с литературными данными [27, 28]. С ВГВ специфически связывались только scFv-фрагменты, полученные из антитела 2/3, что было ожидаемо. Уровни сигналов связывания scFv-2/3-4 и scFv-2/3-6 с ВГВ статистически не отличались.

#### **Оценка вируснейтрализующей активности разработанных scFv-фрагментов in vitro**

Значение показателя  $IC_{50}$  в отношении протестированного штамма рассчитали из кривой «доза-эффект» (рис. 2D) на основании трех независимых повторов. В качестве штамма ВГА использовали A/California/07/09 (H1N1pdm09), а ВГВ – V/Phuket/3073/13 (Yam). Для scFv-фрагментов на основе антитела 2/3, не обладающего нейтрализующими свойствами, так же, как и для исходного иммуноглобулина 2/3, было показано отсутствие протективного действия в отношении ВГВ (как и ВГА) (результаты не представлены).

Полученный нами препарат scFv-FI6-4 проявлял нейтрализующую активность в отношении эталонного штамма вируса гриппа. В качестве референсного препарата использовали рекомбинантный человеческий полноразмерный иммуноглобулин IgG-FI6, полученный нами ранее [29]. Константные области тяжелой и легкой цепей IgG-FI6 были идентичны аминокислотным последовательностям P01857 (IgG1)

и P01834 (κ-изотип) соответственно, согласно базе данных UniProt [30]; переменные области полностью совпадали с фрагментами в составе scFv-FI6-4. Среднее значение показателя  $IC_{50}$ , рассчитанного по трем сериям экспериментов для scFv-FI6-4, составило 170 нг/мл (130, 200 и 180 нг/мл в каждом из экспериментов); для референсного препарата (человеческий IgG-FI6) – 179 нг/мл (208, 160 и 169 нг/мл). Достоверные различия (тест Манна – Уитни для сравнения двух независимых выборок) между полученными значениями  $IC_{50}$  для исходного IgG-FI6 и scFv-FI6-SP4 отсутствовали.

#### **ОБСУЖДЕНИЕ**

Несмотря на значительные достижения в создании противовирусных препаратов, гриппозная инфекция по-прежнему представляет серьезную проблему для общественного здравоохранения [31]. Сравнительно новым узконаправленным терапевтическим подходом является использование антител широкого спектра действия. Тем не менее существуют определенные трудности, связанные с высокопроизводительным получением и очисткой стабильных рекомбинантных иммуноглобулинов [32].

В нашей работе описан доступный и воспроизводимый способ получения scFv-фрагментов на основе антител. Наличие переменных фрагментов исходного полноразмерного антитела в структуре scFv обеспечивает необходимый функционал и высокоспецифическое связывание с мишенью, однако иммуногенность таких терапевтических агентов значительно снижена из-за отсутствия в их составе Fc-фрагмента [4]. Кроме того, получение рекомбинантных scFv-фрагментов происходит с использованием моноплазмидной системы, что помогает избежать проблем с неправильным сочетанием легких и тяжелых цепей [33, 34]. В настоящее время на биофармацевтическом рынке представлено более 30 наименований терапевтических продуктов на основе scFv-фрагментов<sup>5</sup>.

Для получения scFv-фрагментов мы применяли метод ПЦР с перекрывающимися праймерами и в качестве матрицы использовали плазмидные конструкции, кодирующие тяжелую и легкую цепи рекомбинантного антитела. Получение scFv-фрагментов молекулярно-биологическими методами является достаточно простым, дешевым и эффективным способом.

Первичная структура scFv может быть выполнена в ориентации VL-линкер-VH или VH-линкер-VL, а линкер может состоять из разного количества

<sup>5</sup> WHO Drug Information. WHO; 2025. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240112650>

повторов G<sub>4</sub>S. Предпочтительная ориентация scFv зависит от аминокислотной последовательности, и в разных публикациях отмечены разные подходы [35]. В нашей работе для всех scFv была реализована ориентация VL-линкер-VH. Комбинация гибких и гидрофильных аминокислотных остатков линкеров предотвращает образование вторичных структур и снижает вероятность того, что линкеры будут препятствовать сворачиванию и функционированию белковых доменов [36]. Поскольку было неизвестно, как повлияет на активность одноцепочечных антител длина линкера между доменами, для одной из конструкций (scFv-2/3) использовали два типа линкеров с 4 и 6 повторами G<sub>4</sub>S. Эксперименты показали, что длина линкера не влияет на продукцию клетками scFv-фрагментов антитела 2/3 и их функциональные свойства. Сигналы взаимодействия очищенных scFv-2/3-4 и scFv-2/3-6 со специфическим антигеном статистически значимо не отличались.

К недостаткам некоторых рекомбинантных антител относятся низкая стабильность, а также сложность их наработки и очистки [37, 38]. В частности, получение и очистка используемого нами в качестве исходного антитела полноразмерного иммуноглобулина F16 были крайне трудоемкими [12, 13]. Нейтрализующая активность полученного нами scFv-F16-4 была сопоставима с активностью IgG-F16, но получение и очистка scFv были менее трудоемкими.

Наряду с дизайном первичной аминокислотной последовательности было проведено молекулярное моделирование для предсказания 3D-структуры разработанных нами молекул. Известно, что переменные домены иммуноглобулина состоят из β-тяжей, которые соединяются между собой стабилизирующей дисульфидной связью [26]. По данным моделирования, наиболее вероятная структура укладки переменных участков тяжелой и легкой цепей в разработанных нами scFv-фрагментах представляет собой антипараллельные β-нити, что в целом сходно с переменным фрагментом полноразмерного иммуноглобулина.

Таким образом, мы выполнили дизайн и описали подходы к получению scFv-фрагментов антител, обладающих широкой нейтрализующей активностью в отношении HA ВГА и высокой специфичностью к NP ВГВ (не являются нейтрализующими). Описана динамика экспрессии и характеристика очищенных scFv-фрагментов. Продемонстрировано, что полученные scFv-фрагменты специфически

связываются с заявленными антигенами (гемагглютинином ВГА и нуклеопротеином ВГВ). При этом scFv-F16-4 проявляет функциональную активность, сопоставимую с исходным IgG-F16, и дозозависимо нейтрализует ВГА в экспериментах *in vitro*.

Применение scFv-фрагментов для профилактики и лечения ОРВИ представляет особый интерес благодаря ряду преимуществ. Малый размер scFv-фрагментов способствует их эффективному проникновению через слизистые оболочки при интраназальном введении. Это приводит к формированию не только местного иммунного барьера в носоглотке, но и оказывает системный противовирусный эффект, предотвращающий распространение возбудителя по организму. Низкая иммуногенность и короткий период полувыведения снижают риск нежелательных иммунных реакций, что особенно важно для экстренной профилактики и своевременной терапии ОРВИ. В будущем данная стратегия может быть значительно усилена за счет создания биспецифических scFv-фрагментов. Такие конструкции, нацеленные на два эпитопа одновременно, могут обеспечить беспрецедентную эффективность блокирования вируса и преодолеть ограничения моноспецифических антител.

## Выводы

1. На основе рекомбинантных антител, специфичных к вирусу гриппа А и В, осуществлен дизайн и предсказана пространственная структура scFv-фрагментов.
2. Получены три генетические конструкции для экспрессии белков scFv в культуре эукариотических клеток.
3. scFv-фрагменты наработаны и очищены методом аффинной хроматографии с никелевым сорбентом в количестве не менее 0,5 мг и концентрации около 1 мг/мл каждого.
4. Методом электрофореза белков в ПААГ подтверждено соответствие выделенных scFv-фрагментов ожидаемому значению молекулярной массы (~28 кДа).
5. Методом ИФА показано специфическое связывание scFv-фрагментов с различными штаммами вируса гриппа А и В.
6. Установлено, что 50% вируснейтрализующая доза scFv-фрагмента антитела к поверхностному гемагглютинину вируса гриппа (170 нг/мл) сопоставима с 50% вируснейтрализующей дозой исходного полноразмерного антитела (179 нг/мл).

## Литература/References

1. Batool S, Chokkakula S, Song MS, et al. Influenza treatment: Limitations of antiviral therapy and advantages of drug combination therapy. *Microorganisms*. 2023;11(1):183. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010183>
2. Baumgarth N, Carroll MG, Gonzalez S. Antibody-mediated immunity. In: Webster RC, Monto AS, Braciale TJ, eds. *Textbook of influenza*. 2nd ed. J. Wiley & Sons; 2013. P. 283–97. <https://doi.org/10.1002/9781118636817.ch18>
3. Biswas M, Yamazaki T, Chiba J, et al. Broadly neutralizing antibodies for influenza: passive immunotherapy and intranasal vaccination. *Vaccines*. 2020;8(3):424. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030424>
4. Bates A, Power CA. David vs. Goliath: The structure, function, and clinical prospects of antibody fragments. *Antibodies*. 2019;8(2):28. <https://doi.org/10.3390/antib8020028>
5. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, et al. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:980250. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>
6. Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, Plueckthun A. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry*. 1990;29(6):1362–7. <https://doi.org/10.1021/bi00458a002>
7. Tiller KE, Tessier PM. Advances in antibody design. *Annu Rev Biomed Eng*. 2015;17:191–216. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040733>
8. Potter KN, Li Y, Pascual V, et al. Staphylococcal protein: A binding to VH3 encoded immunoglobulins. *Int Rev Immunol*. 1997;14(4):291–308. <https://doi.org/10.3109/08830189709116521>
9. Helfrich W, Haisma H, Magdolen V, et al. A rapid and versatile method for harnessing scFv antibody fragments with various biological effector functions. *J Immunol Methods*. 2000;237(1–2):131–45. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00220-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00220-3)
10. Urushibata Y, Itoh K, Ohshima M, Seto Y. Generation of Fab fragment-like molecular recognition proteins against staphylococcal enterotoxin B by phage display technology. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(11):1708–17. <https://doi.org/10.1128/CVI.00229-10>
11. Corti D, Voss J, Gamblin SJ, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science*. 2011;333(6044):850–6. <https://doi.org/10.1126/science.1205669>
12. Aliev TK, Dement'yeva IG, Toropova VA, et al. Development and properties of recombinant proteins based on the broadly neutralizing antibody to influenza A virus. *Moscow Univ Biol Sci Bull*. 2016;71(2):87–92. <https://doi.org/10.3103/S0096392516020012>
13. Argentova VV, Aliev TK, Toropova VA, et al. Studies on the influence of different designs of eukaryotic vectors on the expression of recombinant IgA. *Moscow Univ Biol Sci Bull*. 2017;72(2):63–8. <https://doi.org/10.3103/S0096392517020018>
14. Zhang P, Vemula SV, Zhao J, et al. A highly sensitive europium nanoparticle-based immunoassay for detection of influenza A/B virus antigen in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4385–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.02635-14>
15. Hilgarth RS, Lanigan TM. Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction. *MethodsX*. 2020;7:100759. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.12.001>
16. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990;96(1):23–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)
17. Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024;630(8016):493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
18. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
19. Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004;25(9):1327–33. <https://doi.org/10.1002/elps.200305844>
20. Killian ML. Hemagglutination assay for influenza virus. In: Spackman E, ed. *Animal influenza virus*. NY: Springer; 2014. P. 3–9. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_1)
21. Haryadi R, Ho S, Kok YJ, et al. Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116878>
22. Myhrinder G. *Optimizing signal peptides for expression of recombinant antibodies in HEK293 cells*. Linköpings universitet; 2020.
23. Bryksin A, Matsumura I. Overlap extension PCR cloning. In: Polizzi K, Kontoravdi C, eds. *Synthetic biology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. P. 31–42. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-625-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-625-2_4)
24. Burmester J, Plückthun A. Construction of scFv fragments from hybridoma or spleen cells by PCR assembly. In: Kontermann R, Dübel S, eds. *Antibody engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2001. P. 19–40. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-04605-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-04605-0_2)
25. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
26. de Sousa-Pereira P, Woof JM. IgA: structure, function, and developability. *Antibodies (Basel)*. 2019;8(4):57. <https://doi.org/10.3390/antib8040057>
27. Kallewaard NL, Corti D, Collins PJ, et al. Structure and function analysis of an antibody recognizing all influenza A subtypes. *Cell*. 2016;166(3):596–608. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.073>
28. Morgan SB, Holzer B, Hemmink JD, et al. Therapeutic administration of broadly neutralizing F16 antibody reveals lack of interaction between human IgG1 and pig Fc receptors. *Front Immunol*. 2018;9:865. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00865>
29. Argentova VV, Aliev TK, Zarubaev VV, et al. *In vitro* antiviral activity of recombinant antibodies of IgG and IgA isotypes to hemagglutinin of the influenza A virus. *Mol Biol*. 2017;51(6):804–12. <https://doi.org/10.1134/S0026893317060024>
30. Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, et al. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Suppl\_1):D154–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gki070>
31. Li Y, Huo S, Yin Z, et al. Retracted and republished from: “The current state of research on influenza antiviral drug development: drugs in clinical trial and licensed drugs”. *mBio*. 2024;15(5):e0017524. <https://doi.org/10.1128/mbio.00175-24>
32. Tsumoto K, Isozaki Y, Yagami H, Tomita M. Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies. *Immunotherapy*. 2019;11(2):119–27. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0130>
33. Harkins K. Antibody purification methods. In: Howard GC, Bethell DR, eds. *Basic methods in antibody production and characterization*. Boca Raton: CRC Press; 2000. P. 141–68. <https://doi.org/10.1201/9781420036534.ch11>
34. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):1. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
35. Sandomenico A, Sivaccumar JP, Ruvo M. Evolution of *Escherichia coli* expression system in producing antibody

- recombinant fragments. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6324. <https://doi.org/10.3390/ijms21176324>
36. van Rosmalen M, Krom M, Merckx M. Tuning the flexibility of glycine-serine linkers to allow rational design of multi-domain proteins. *Biochemistry.* 2017;56(50):6565–74. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00902>
37. Ewert S, Honegger A, Plückthun A. Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods.* 2004;34(2):184–99. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2004.04.007>
38. Wörn A, Plückthun A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol.* 2001;305(5):989–1010. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4265>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.А. Плотникова** – подготовка и проведение экспериментов, обработка и анализ данных, визуализация, написание и редактирование текста рукописи; **В.А. Топорова** – получение генно-инженерных конструкций, концептуализация, редактирование текста рукописи; **Е.А. Романовская-Романько** – подготовка и проведение экспериментов, обработка и анализ данных, визуализация; **А.А. Шалджян** – проведение хроматографической очистки, визуализация; **С.А. Клотченко** – концептуализация, общее руководство проектом, привлечение финансирования, рецензирование и редактирование текста рукописи, утверждение окончательной 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. **M.A. Plotnikova** prepared and conducted the experiments, processed and analysed the data, visualised, drafted, and edited the manuscript. **V.A. Toporova** obtained gene-engineered constructs, conceptualised, and edited the manuscript. **E.A. Romanovskaya-Romanko** prepared and executed the experiments, processed, analysed, and visualised data. **A.A. Shaldzhyan**, performed chromatographic purification and visualisation. **S.A. Klotchenko** conceptualised, supervised the overall project, fundraised, reviewed and edited the manuscript, and approved the final version for publication.

## Об авторах / Authors

**Плотникова Марина Александровна**, канд. биол. наук / **Marina A. Plotnikova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8196-3156>

**Топорова Виктория Александровна** / **Viktoriya A. Toporova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7450-7096>

**Романовская-Романько Екатерина Андреевна**, канд. биол. наук / **Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7560-398X>

**Шалджян Арам Арутюнович** / **Aram A. Shaldzhyan**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8646-6252>

**Клотченко Сергей Анатольевич**, канд. биол. наук / **Sergey A. Klotchenko**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0289-6560>

Поступила 21.09.2025

После доработки 08.11.2025

Принята к публикации 12.12.2025

Online first 26.12.2025

Received September 21, 2025

Revised November 8, 2025

Accepted December 12, 2025

Online first December 26, 2025

УДК 60:615.07:578.81

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-67-74>

Оригинальная статья | Original article



## Долгосрочная стабильность липосомальной формы микобактериофага D29: комплексная оценка *in vitro*

В.В. Авдеев , М.Б. Лапенкова , М.А. Владимирский 

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Достоевского, д. 4, корп. 1,  
Москва, 127473, Российская Федерация

✉ Авдеев Вадим Вадимович; [vadim.avdeev@rambler.ru](mailto:vadim.avdeev@rambler.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Распространение устойчивых к антибиотикам микобактерий создает потребность в новых терапевтических подходах лечения туберкулеза, одним из которых является фаготерапия. Использование липосомальных форм микобактериофагов рассматривается как способ повышения их эффективности, однако для дальнейшего применения таких препаратов необходима комплексная оценка их стабильности.

**ЦЕЛЬ.** Оценить долгосрочную (6 мес.) стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 в условиях хранения при 4 °С по комплексу физико-химических и функциональных показателей для обоснования ее дальнейшего доклинического изучения.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 оценивали в условиях хранения в течение 6 мес. при температуре 4 °С. Отбор проб проводили в следующие временные точки: 0; 1,5; 3; 4,5 и 6 мес. Степень инкапсуляции (%) фага определяли методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Поверхностный заряд (дзета-потенциал) измеряли методом электрофоретического рассеяния света (доплеровской электрофоретической подвижности). Морфологию липосом анализировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Функциональную активность оценивали по литической активности методом титрования по Грациа с использованием *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Продемонстрирована высокая стабильность липосомальной формы фага D29. Литическая активность сохранялась на уровне ~10<sup>9</sup> БОЕ/мл в течение срока хранения (6 мес., 4 °С). Степень инкапсуляции снизилась незначительно и составила >88% от исходного значения. Постоянство значения дзета-потенциала (от -6,1±0,3 до -8,2±0,5 мВ) указывает на коллоидную стабильность суспензии без агрегации частиц в течение срока хранения.

**ВЫВОДЫ.** Установлена высокая физико-химическая и функциональная стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 при длительном хранении (6 мес., 4 °С) с сохранением литической активности и высокой степени инкапсуляции. Полученные результаты обосновывают перспективность дальнейшего доклинического и клинического изучения разработанной липосомальной формы для терапии микобактериальных инфекций.

**Ключевые слова:** микобактериофаг D29; липосомы; стабильность препарата; инкапсуляция; дзета-потенциал; просвечивающая электронная микроскопия; длительное хранение; литическая активность

**Для цитирования:** Авдеев В.В., Лапенкова М.Б., Владимирский М.А. Долгосрочная стабильность липосомальной формы микобактериофага D29: комплексная оценка *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(1):67–74. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-67-74>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России, регистрационный № НИОТКР 121031600067-1 «Разработка нового противотуберкулезного лекарственного препарата на основе липосомальной формы микобактериофага D29 для лечения туберкулеза легких, в том числе лекарственно устойчивых форм».

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

© В.В. Авдеев, М.Б. Лапенкова, М.А. Владимирский, 2026  
Издатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

# Long-term stability of liposomal mycobacteriophage D29: A comprehensive *in vitro* assessment

Vadim V. Avdeev<sup>✉</sup> , Marina B. Lapenkova , Mikhail A. Vladimirsky 

National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation, 4/1 Dostoevsky St., Moscow 127473, Russian Federation

✉ Vadim V. Avdeev; [vadim.avdeev@rambler.ru](mailto:vadim.avdeev@rambler.ru)

## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** The spread of antibiotic-resistant mycobacteria necessitates new therapeutic approaches for tuberculosis, phage therapy being one of them. Liposomal mycobacteriophages are considered to be a way to enhance their efficacy; however, a comprehensive assessment of their stability is warranted for the further use of such preparations.

**AIM.** This study aimed to evaluate the long-term stability (over six months) of a liposomal form of mycobacteriophage D29 under storage conditions at 4 °C based on a set of physicochemical and functional parameters to substantiate its further preclinical study.

**MATERIALS AND METHODS.** The stability of liposomal form D29 was assessed over six months of storage at 4 °C. Sampling was performed at the following time points: 0; 1.5; 3; 4.5; and 6 months. The degree of phage encapsulation (%) was quantified by real-time polymerase chain reaction (qPCR). The surface charge (zeta potential) was measured by electrophoretic light scattering (Doppler electrophoretic mobility). Liposome morphology was analyzed using transmission electron microscopy. Functional activity was assessed by determining lytic activity via the Grazia titration method on *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 culture.

**RESULTS.** High stability of the liposomal phage D29 form was demonstrated. Lytic activity remained at a level of ~10<sup>9</sup> PFU/mL throughout the storage period (six months, 4 °C). The degree of encapsulation decreased insignificantly (>88% of the initial value). The constant zeta potential value (from -6.1±0.3 to -8.2±0.5 mV) confirmed colloidal stability of the suspension without particle aggregation throughout the entire storage period.

**CONCLUSIONS.** The liposomal mycobacteriophage D29 demonstrates high physicochemical and functional stability after long-term storage (six months, 4 °C), with preserved lytic activity and a high degree of encapsulation. The findings substantiate the prospects for further preclinical and subsequent clinical trial of this preparation designed to treat mycobacterial infections.

**Keywords:** mycobacteriophage D29; liposomes; drug stability; encapsulation; zeta potential; transmission electron microscopy; long-term storage; lytic activity

**For citation:** Avdeev V.V., Lapenkova M.B., Vladimirsky M.A. Long-term stability of liposomal mycobacteriophage D29: A comprehensive *in vitro* assessment. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(1):67–74. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-67-74>

**Funding.** The work was carried out as part of the state assignment of the National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation, registration No. NIOTKR 121031600067-1 Development of a New Anti-Tuberculosis Drug Based on the Liposomal Mycobacteriophage D29 for the Treatment of Pulmonary Tuberculosis, Including Drug-Resistant Forms.

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез, вызываемый *Mycobacterium tuberculosis*, остается одной из основных причин смертности от инфекционных болезней в мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2022 г. было зарегистрировано более 10 млн новых случаев заболевания, а число летальных исходов составило около 1,3 млн<sup>1</sup>. Лечение осложняется ростом числа случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью

и широкой лекарственной устойчивостью [1, 2], а также тяжелыми инфекциями, вызванными нетуберкулезными микобактериями, такими как *M. avium* complex и *M. abscessus* complex, у иммунокомпрометированных пациентов [3].

Антибиотикотерапия микобактериальных инфекций сопряжена с рядом ограничений, к которым относятся длительность курса лечения (6–24 мес.), высокая токсичность препаратов и формирование лекарственной устойчивости [4, 5],

<sup>1</sup> Global tuberculosis report 2023. Geneva: WHO; 2023.

что стимулирует поиск альтернативных методов лечения, таких как фаготерапия [6].

Интерес к медицинскому применению бактериофагов (фаготерапия), снизившийся в эру антибиотиков, возрождается в условиях кризиса антибиотикорезистентности [7, 8]. В частности, микобактериофаг D29 обладает литической активностью в отношении широкого спектра микобактерий, включая патогенные *M. tuberculosis*, *M. abscessus*, а также нетуберкулезные *M. smegmatis* и др. [9]. Преимуществами фага D29 являются высокая специфичность к микобактериям, способность лизировать как быстро-, так и медленно растущие штаммы, а также низкая токсичность для эукариотических клеток [10]. Однако применение свободных фагов в клинической практике ограничивается их низкой стабильностью при хранении [11]. Инкапсуляция фагов в липосомы позволяет защитить вирусные частицы от деградации и воздействия факторов внешней среды (рН, ферменты, иммунная система), а также обеспечить контролируемое высвобождение [12, 13]. Липосомальные системы доставки увеличивают время циркуляции фагов в организме [14] и повышают эффективность доставки в очаг инфекции [15], в том числе ингаляционным путем [16]. В то же время исследование липосомальных форм микобактериофагов, в частности данные об их долгосрочной стабильности, остаются ограниченными [17, 18].

Цель работы – оценить долгосрочную (6 мес.) стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 в условиях хранения при 4 °С по комплексу физико-химических и функциональных показателей для обоснования ее дальнейшего доклинического изучения.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- разработать методику получения и контроля качества липосомальной формы микобактериофага D29;
- оценить изменение литической активности инкапсулированного фага в течение 6 мес. хранения при температуре 4 °С;
- определить динамику степени инкапсуляции фага методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ);
- исследовать коллоидную стабильность (дзета-потенциал) и морфологию липосом с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Получение микобактериофага D29

Микобактериофаг D29 размножали в культуре *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, которую выращивали на плотной питательной среде

Миддлбрука 7H10 (HiMedia, Индия). Суспензию *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 культивировали в 50 мл жидкой питательной среды Миддлбрука 7H9 (HiMedia, Индия), содержащей 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, до достижения оптической плотности 1,0. Инкубацию проводили в течение 1 сут при перемешивании (70 об/мин, 37 °С), затем добавляли 5 мл микобактериофага D29 с титром 10<sup>7</sup>–10<sup>8</sup> бляшкообразующих единиц в 1 мл (БОЕ/мл) для обеспечения множественности заражения, близкой к 0,1, для оптимизации выхода зрелых фаговых частиц. После дополнительной суточной инкубации в тех же условиях суспензию центрифугировали (3000 об/мин, 15 мин) и фильтровали супернатант через стерильный мембранный фильтр 0,22 мкм (Merck Millipore, США).

Титр фага определяли методом серийных десятикратных разведений. Готовили серию последовательных десятикратных разведений очищенного фагового препарата в стерильном фаговом буферном растворе (0,01 М Tris-HCl, 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,1 М NaCl, рН 7,5). Аликвоту каждого разведения (100 мкл) наносили на поверхность плотной агаризованной питательной среды 7H10 в чашках Петри, предварительно засеянных плотным газоном *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155. После адсорбции фага при комнатной температуре в течение 20 мин чашки инкубировали при 37 °С 24 ч до появления четких зон лизиса (бляшек). Подсчет бляшек проводили в тех разведениях, в которых их количество составляло от 5 до 100 на чашку. Титр фага (БОЕ/мл) рассчитывали по формуле (1):

$$\text{Титр} = (N \times D) / V, \quad (1)$$

где  $N$  – среднее количество бляшек в разведении,  $D$  – коэффициент разведения,  $V$  – объем пробы, внесенной на чашку (0,1 мл). Для последующей инкапсуляции использовали препараты с титром не менее 1×10<sup>9</sup> БОЕ/мл. Данный критерий был установлен для обеспечения высокой стартовой нагрузки фага в липосомы.

### Хроматографическая очистка микобактериофага D29

Микобактериофаг D29, полученный в культуре *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, очищали от компонентов лизата микобактерий, содержащего смесь липаз, протеаз и разрушенных молекул ДНК, с помощью анионообменной хроматографии на сорбенте Sepromax (Galak, Китай) на хроматографе BioLogic LP (BioRad, США). Препарат микобактериофага D29 наносили на колонку, предварительно уравновешенную фаговым буферным раствором (0,01 М Tris-HCl, 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,1 М NaCl, рН 7,5). После сбора фракций первого пика увеличивали молярность раствора до 1 М NaCl и собирали фракции второго

пика, содержащие фаговые частицы. Препарат дилировали против фагового буферного раствора в течение 1 сут на магнитной мешалке RCT Basic IKA MAG (IKA, Германия) (110 об/мин, 4 °С) и стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм).

#### **Получение липосом с включением микобактериофага D29 методом экструзии**

Липидную пленку формировали из смеси 30 мг фосфатидилхолина (Sigma-Aldrich, США) и 10 мг холестерина (Sigma-Aldrich, США) путем растворения компонентов в 3 мл 95% этанола и высушивания на роторном испарителе (RV 3 V-C, IKA Германия). Далее липидную пленку ресуспендировали в 3 мл очищенного препарата микобактериофага D29 путем встряхивания колбы с компонентами в течение 5 мин. Полученные многослойные липосомы последовательно экстрадировали через фильтры с помощью стерильного шприца для получения однослойных липосом: однократно через фильтр 5 мкм (Merck Millipore, США), затем 19 раз через фильтр 0,45 мкм (Merck Millipore, США) и дополнительно однократно через новый фильтр 0,45 мкм.

#### **Оценка стабильности липосомальной формы микобактериофага D29**

Стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 исследовали в течение 6 мес. при температуре хранения 4 °С с использованием следующих методов.

##### *Определение литической активности по Грациа.*

Данный метод является стандартом оценки активности фагов [19]. В основе метода лежит подсчет БОЕ на *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 методом серийных разведений, что позволяет оценить сохранение литической способности фага после инкапсуляции и в процессе хранения. Для проведения исследования образец липосомальной суспензии предварительно обрабатывали 1% раствором тритона X-100 (Servicebio, Китай) в течение 10 мин при комнатной температуре для полного разрушения липидных мембран и высвобождения инкапсулированных фаговых частиц. Далее проводили серийные десятикратные разведения и определяли титр БОЕ на газоне *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 на плотной питательной среде 7H10. После адсорбции и инкубации при 37 °С в течение 24 ч проводили подсчет бляшек.

*Степень инкапсуляции фага (%)* характеризует эффективность включения вирусных частиц в липосомальные везикулы. После центрифугирования липосом при 14000 об/мин (Minispin, Eppendorf, Германия) проводили определение доли инкапсулированных фагов с помощью ПЦР-РВ [20]. Для амплификации использовали праймеры (НПК «Синтол», Россия): D29-F (5'-agccgatcagaag-cacggg-3') и D29-R (5'-agcggctcttaggagggg-3'),

а также флуоресцентный ДНК-зонд Pb\_D29\_up\_FAM (5'-(FAM)-agccsagaactcgcgaccaccg-(RTQ1)-3'). Амплификацию проводили с использованием прибора CFX96 (Bio-Rad, США). Состав реакционной смеси (25 мкл): 5 мкл образца ДНК, 1× ПЦР-буфер (500 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,8), 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, смесь dNTP (по 250 мкМ каждого), 3 пмоль ДНК-зонда Pb\_D29\_up\_FAM, 5 пмоль каждого праймера (D29-F и D29-R) и 2,5 ед. Taq-полимеразы. Протокол амплификации: начальная денатурация при 95 °С в течение 2 мин, далее 40 циклов: 15 с – 95 °С (денатурация), 40 с – 63 °С (отжиг и элонгация).

Степень инкапсуляции (E, %) микобактериофага в липосомах рассчитывали по формуле (2):

$$E = \left( \left( 2^{(Ct_{\text{общий}} - Ct_{\text{осадок}})} \times V_{\text{осадок}} \right) / V_{\text{общий}} \right) \times 100\%, \quad (2)$$

где  $Ct_{\text{общий}}$  – пороговый цикл для исходного препарата,  $Ct_{\text{осадок}}$  – пороговый цикл для осадка,  $V_{\text{осадок}}$  – объем осадка,  $V_{\text{общий}}$  – объем препарата.

*Дзета-потенциал* липосомальных препаратов измеряли методом лазерной доплеровской электрофоретической подвижности с использованием анализатора Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Великобритания). Данный показатель свидетельствует о коллоидной стабильности и отсутствии агрегации частиц [21].

*Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)* позволяет визуализировать морфологию бактериофагов и липосом, оценить их размеры и целостность, а также выявить возможные структурные изменения липосомальных везикул (агрегация, фрагментация или деформация мембраны) при хранении [22]. Образцы липосомальной суспензии готовили методом отрицательного контрастирования с использованием 2% водного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты (pH 7,0). Каплю препарата наносили на медные сетки, покрытые формваровой пленкой, инкубировали в течение 1 мин, после чего удаляли избыток жидкости фильтровальной бумагой и наносили контрастирующий раствор на 30 с. Избыток красителя удаляли и сетки высушивали на воздухе. Образцы визуализировали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400Plus (JEOL, Япония) с цифровой камерой Gatan Rio (Gatan, США) в режиме светлого поля при ускоряющем напряжении 60–80 кВ.

Параметры контроля стабильности липосомальной формы микобактериофага D29 представлены в *таблице 1*.

#### **Дизайн исследования**

Исследование включало три последовательных этапа. На первом этапе готовили очищенный препарат микобактериофага D29 (объем 15 мл). Препарат хранили при температуре 4 °С

**Таблица 1.** Параметры контроля стабильности липосомальной формы микобактериофага D29**Table 1.** Parameters for monitoring stability of the liposomal mycobacteriophage D29

Параметр <i>Parameter</i>	Критерий стабильности <i>Stability criterion</i>
Активность по Грациа <i>Grazia method</i>	Сохранение титра на уровне $10^8$ – $10^9$ БОЕ/мл <i>Keeping the titer at <math>10^8</math>–<math>10^9</math> PFU/mL</i>
Степень инкапсуляции, % <i>Encapsulation efficiency, %</i>	Снижение эффективности инкапсуляции не более чем на 15% от исходного значения <i>Loss of encapsulation degree is no more than 15%</i>
Дзета-потенциал, мВ <i>Zeta potential, mV</i>	Изменение значения не более чем на 15% от исходного значения <i>Zeta potential change no more than 15% of the initial value</i>
Морфология (ПЭМ) <i>Morphology (TEM)</i>	Наличие инкапсулированных фагов в липосомах в $\geq 5$ полях зрения <i>Presence of encapsulated phages in liposomes in 5 fields of vision</i>

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

*Примечание.* БОЕ – бляшкообразующие единицы; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

*Note.* PFU, plaque-forming units; TEM, transmission electron microscopy.

не более 14 сут до дальнейшего использования. За 24 ч до начала второго этапа оценивали литическую активность препарата методом титрования по Грациа. В случае если титр фага определялся в диапазоне  $10^8$ – $10^9$  БОЕ/мл, переходили к следующему этапу. Данная временная точка была обозначена как «точка 0».

На втором этапе получали липосомальную форму микобактериофага методом экструзии. После приготовления препарата отбирали пробы для комплексного анализа: определения литической активности методом Грациа (100 мкл), оценки степени инкапсуляции (2 пробы по 100 мкл), измерения дзета-потенциала (100 мкл) и ПЭМ (200 мкл). Все пробы хранили при 4 °С не более 7 сут.

На третьем этапе исследовали стабильность препарата в процессе хранения. Пробы отбирали через 1,5; 3; 4,5 и 6 мес. Объемы проб, условия анализа и температурный режим (4 °С) были идентичны таковым для исходного образца (точка 0). Для всех образцов определяли литическую активность, степень инкапсуляции, дзета-потенциал и морфологию липосом.

Все количественные измерения проводили в трех повторностях для каждой временной точки. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование стабильности липосомальной формы микобактериофага D29 в течение 6 мес. хранения при температуре 4 °С продемонстрировало высокую стабильность липосом (табл. 2). Литическая активность липосом сохранялась на исходном уровне значений ( $\sim 10^9$  БОЕ/мл) в течение 4,5 мес. с незначительным снижением до  $(7,2 \pm 0,4) \times 10^8$  БОЕ/мл к 6 мес. Степень инкапсуляции фага также оставалась стабильной, незначительно снизившись с  $34,1 \pm 1,5$  до  $30,2 \pm 1,8$

**Таблица 2.** Характеристики липосомальной формы микобактериофага D29 в течение 6 мес. хранения при температуре 4 °С

Параметр <i>Parameter</i>	Показатель / <i>Value</i>				
	0 мес. / <i>0 months</i>	1,5 мес. / <i>1.5 months</i>	3 мес. / <i>3 months</i>	4,5 мес. / <i>4.5 months</i>	6 мес. / <i>6 months</i>
Литическая активность, БОЕ/мл <i>Phage activity, PFU/mL</i>	$(1,02 \pm 0,09) \times 10^9$	$(1,05 \pm 0,11) \times 10^9$	$(0,98 \pm 0,08) \times 10^9$	$(0,95 \pm 0,12) \times 10^9$	$(7,2 \pm 0,4) \times 10^8$
Степень инкапсуляции, % <i>Encapsulation efficiency, %</i>	34,1 $\pm$ 1,5	33,7 $\pm$ 1,7	32,3 $\pm$ 1,9	31,4 $\pm$ 2,1	30,2 $\pm$ 1,8
Дзета-потенциал, мВ <i>Zeta potential, mV</i>	-6,0 $\pm$ 0,3	-6,0 $\pm$ 0,3	-8,0 $\pm$ 0,6	-8,0 $\pm$ 0,5	-8,0 $\pm$ 0,5
Морфология (ПЭМ) <i>Morphology (TEM)</i>	2–3 липосомы в поле зрения, структура липосом не изменена <i>2–3 liposomes per field of vision. Liposome structure remains unchanged</i>	2–3 липосомы в поле зрения, структура липосом не изменена <i>2–3 liposomes per field of vision. Liposome structure remains unchanged</i>	2–3 липосомы в поле зрения, структура липосом не изменена <i>2–3 liposomes per field of vision. Liposome structure remains unchanged</i>	2–3 липосомы в поле зрения, структура липосом частично изменена <i>2–3 liposomes per field of vision. Liposome structure partially altered</i>	2–3 липосомы в поле зрения, структура липосом частично изменена <i>2–3 liposomes per field of vision. Liposome structure partially altered</i>

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

*Примечание.* БОЕ – бляшкообразующие единицы; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

*Note.* PFU, plaque-forming units; TEM, transmission electron microscopy.

за 6 мес., что соответствует установленному критерию (потери <15%).

Показатель дзета-потенциала сохранял стабильные значения (от  $-6,1 \pm 0,3$  до  $-8,2 \pm 0,5$  мВ) на протяжении всего срока хранения, что свидетельствует об отсутствии агрегации частиц и коллоидной стабильности суспензии.

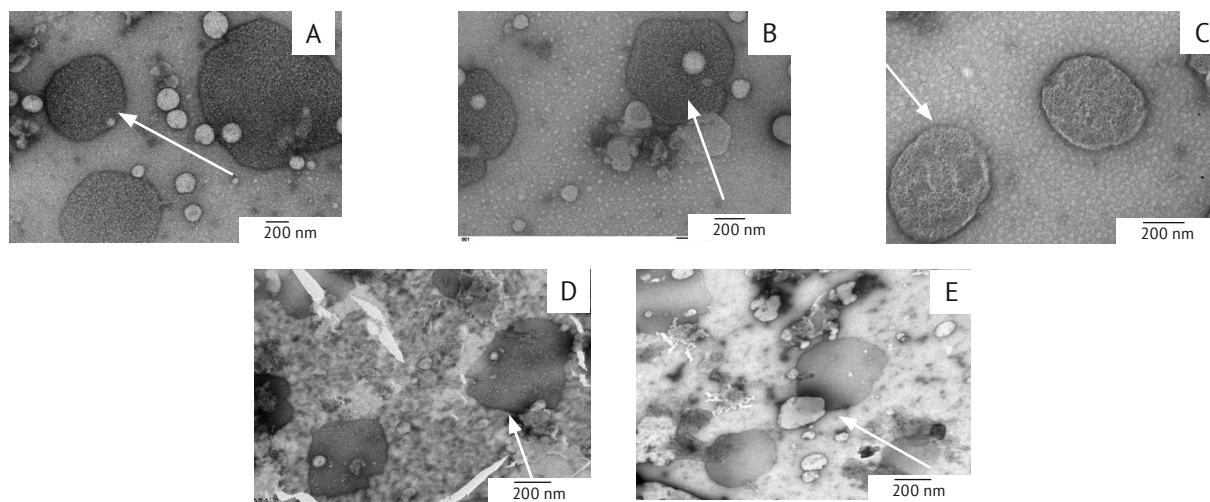
Данные ПЭМ-микроскопии (рис. 1) подтвердили сохранение липосомальных везикул во всех временных точках. После 4,5 и 6 мес. хранения у части везикул отмечена измененная морфология (деформация, нарушение сферической формы), что может быть связано с частичной дестабилизацией липидной мембраны [23]. Важно, что эти изменения не привели к значительному снижению функциональной активности или степени инкапсуляции.

Сохранение литической активности в пределах одного порядка величины свидетельствует о стабильности разработанной липосомальной формы в данных условиях хранения и сохранении способности к специфическому взаимодействию с клетками-мишенями. Эти данные согласуются с результатами исследований других липосомальных фаговых препаратов, демонстрирующих сохранение активности фагов при длительном хранении [13], что является

ключевым требованием для разработки и клинического применения лекарственных форм.

Относительно незначительное изменение степени инкапсуляции микобактериофага D29 в липосомах после 6 мес. хранения (более 88% от исходной степени инкапсуляции) свидетельствует об отсутствии существенной деградации липидных мембран и сохранении целостности липосомальных везикул. Представленные результаты коррелируют с данными о высокой стабильности липосом на основе фосфатидилхолина и холестерина при хранении, которая обеспечивается низкой проницаемостью и жесткостью бислоя, что препятствует деградации инкапсулированных агентов [23]. Метод ПЦР-РВ продемонстрировал свою эффективность для точного количественного определения доли инкапсулированных фаговых частиц, что ранее было показано в работе S. Cinquerrui с соавт. [20].

Постоянство дзета-потенциала указывает на отсутствие агрегации липосомальных частиц и сохранение коллоидной стабильности системы, что предотвращает флокуляцию, седиментацию и обеспечивает равномерное распределение частиц в суспензии. Эти результаты согласуются с данными о коллоидной стабильности липосом, описанными M. Immordino с соавт. [24].



**Рис. 1.** Просвечивающая электронная микроскопия липосомальной формы микобактериофага D29. А – исходное состояние липосом (точка 0): липосомы сферической формы, мембрана четко выражена; В – липосомы после 1,5 мес. хранения: сохранена исходная морфология, визуализируются везикулы; С – липосомы после 3 мес. хранения: сохранена исходная морфология, визуализируются везикулы; D – липосомы после 4,5 мес. хранения: частичное изменение морфологии липосом (по сравнению с А, В, С) и мембраны; E – липосомы после 6 мес. хранения: частичное изменение морфологии липосом (по сравнению с А, В, С) и мембраны. Стрелками отмечены липосомы с инкапсулированными частицами микобактериофага. Диаметр липосом: 0,3–0,45 мкм. Масштаб шкалы: 200 нм.

**Fig. 1.** Transmission electron microscopy (TEM) of the liposomal mycobacteriophage D29. A, initial state of liposomes (point 0); liposomes have a spherical shape, the membrane is clearly visible. B, liposomes stored for 1.5 months, the original morphology of the liposomes is preserved, the vesicles (liposomes) are visible. C, liposomes stored for 3 months, the original morphology of the liposomes is maintained, vesicles are visible. D, liposomes stored for 4.5 months, a partial change in liposome morphology (compared to A, B, C) and membrane. E, liposomes stored for 6 months, a partial change in liposome morphology (compared to A, B, C) and membrane. Arrows point to liposomes with encapsulated mycobacteriophage particles. Liposome diameter: 0.3–0.45  $\mu\text{m}$ . Scale bar: 200 nm.

Таким образом, липосомальная форма микобактериофага D29 продемонстрировала высокую стабильность по уровню литической активности, степени инкапсуляции, дзета-потенциалу после 6 мес. хранения при температуре 4 °С, что удовлетворяет установленным критериям стабильности для препаратов длительного хранения.

Настоящее исследование имеет ряд ограничений. Оценка стабильности проводилась только в условиях фиксированной температуры (4 °С), что не позволяет экстраполировать полученные данные на иные температурные режимы хранения или транспортировки. Кроме того, использованная модель *in vitro* не учитывает влияние биологических жидкостей и ферментов макроорганизма на целостность липосомальной мембраны. Дальнейшие этапы работы предусматривают оценку стабильности разработанной лекарственной формы в условиях, моделирующих температурные колебания, а также изучение кинетики высвобождения фага *in vitro* в средах,

имитирующих бронхоальвеолярный лаваж, и *ex vivo* на изолированных макрофагах.

## ВЫВОДЫ

1. Установлена высокая функциональная стабильность липосомальной формы микобактериофага D29 при хранении в течение 6 мес. при температуре 4 °С, которая характеризуется сохранением литической активности на уровне ~10<sup>9</sup> БОЕ/мл.
2. Показана высокая физико-химическая стабильность препарата: сохранение степени инкапсуляции фага (>88% от исходной) и постоянство дзета-потенциала, что свидетельствует о целостности липосом и коллоидной стабильности суспензии без агрегации частиц.
3. Полученные результаты обосновывают перспективность дальнейшего доклинического и клинического изучения разработанной липосомальной формы в качестве препарата для терапии микобактериальных инфекций.

## Литература/References

1. Dean AS, Tosas Auguet O, Glaziou P, et al. 25 years of surveillance of drug-resistant tuberculosis: achievements, challenges, and way forward. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(7):e191–6. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(21\)00808-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(21)00808-2)
2. Стерликов СА, Васильева ИА, Михайлова ЮВ и др. Новое определение и эпидемиология туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза в 2020 году. *Туберкулез и болезни легких*. 2023;101(2):14–9. Sterlikov SA, Vasilyeva IA, Mikhaylova YuV, et al. The new definition and epidemiology of extensive drug resistant tuberculosis in 2020. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2023;101(2):14–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-2-14-19>
3. Васильева ИА, Панова АЕ, Тинькова ВВ и др. Антибиотикорезистентность *Mycobacterium avium* в период пандемии. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2024;26(4):462–9. Vasilyeva IA, Panova AE, Tinkova VV, et al. Antimicrobial resistance of *Mycobacterium avium* during the COVID-19 pandemic. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2024;26(4):462–9. <https://doi.org/10.36488/cmhc.2024.4.462-469>
4. Можокина ГН, Зюзя ЮР, Петрова ЛЮ и др. Токсичность схем терапии лекарственно устойчивого туберкулеза. *Антибиотики и химиотерапия*. 2021;66(11–12):25–30. Mozhokina GN, Zyuzya YuR, Petrova LYu, et al. Toxicity of treatment regimens for drug-resistant tuberculosis. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2021;66(11–12):25–30 (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-25-30>
5. Абрамченко АВ, Романова МИ, Гайда АИ и др. Эффективность и безопасность коротких режимов химиотерапии лекарственно-устойчивого туберкулеза: обзор литературы и метаанализ. *Туберкулез и болезни легких*. 2025;103(2):26–37. Abramchenko AV, Romanova MI, Gayda AI, et al. Effectiveness and safety of short-course chemotherapy regimens for drug-resistant tuberculosis: Literature review and meta-analysis. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2025;103(2):26–37 (In Russ.). <https://doi.org/10.58838/2075-1230-2025-103-2-26-37>
6. Васильева ИА. Достижения и перспективы инновационных исследований в области фтизиатрии. *Вестник Российской академии наук*. 2025;(1):63–74. Vasilyeva IA. Achievements and prospects of innovative research in the field of phthisiology. *Herald of the Russian Academy of Sciences*. 2025;(1):63–74 (In Russ.). <https://doi.org/10.7868/S3034520025010063>
7. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011;1(2):66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>
8. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017;8(3):162–73. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>
9. Jacobs-Sera D, Hatfull GF. On the nature of mycobacteriophage diversity and host preference. *Virology*. 2012;434(2):187–201. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.026>
10. Pope WH, Bowman CA, Russell DA, et al. Expanding the diversity of mycobacteriophages: insights into genome architecture and evolution. *PLoS One*. 2011;6(1):e16329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016329>
11. Flint R, Laucirica DR, Chan HK, et al. Stability considerations for bacteriophages in liquid formulations designed for nebulization. *Cells*. 2023;12(16):2057. <https://doi.org/10.3390/cells12162057>
12. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
13. Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, et al. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(14):4841–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.00812-15>

14. Kumar A, Arun JK, Matta Y, et al. Optimization of nano-liposome formulations for targeted delivery of hydrophobic drugs. *Front Health Inform.* 2024;13(7):745–57.
15. Sawant RR, Torchilin VP. Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *AAPS J.* 2012;14(2):303–15. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9330-0>
16. Leung SSY, Parumasivam T, Gao FG, et al. Production of inhalation phage powders using spray freeze drying and spray drying techniques for treatment of respiratory infections. *Pharm Res.* 2016;33(6):1486–96. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1892-6>
17. Avdeev VV, Kuzin VV, Vladimirovsky MA, Vasilieva IA. Experimental studies of the liposomal form of lytic mycobacteriophage D29 for the treatment of tuberculosis infection. *Microorganisms.* 2023;11(5):1214. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051214>
18. Avdeev VV, Vladimirovsky MA, SamoiloVA AG, Vasilieva IA. Therapeutic efficacy against a drug-resistant strain of *M. tuberculosis* in an experimental study on inbred mice and associated toxicity evaluation. *Phage (New Rochelle).* 2025;6(2). <https://doi.org/10.1089/phage.2024.0066>
19. Šimoliūnas E, Vilkaitytė M, Kaliniene L, et al. Incomplete LPS Core-Specific Felix01-Like Virus vB\_EcoM\_VpaE1. *Viruses.* 2015;7(12):6163–81. <https://doi.org/10.3390/v7122932>
20. Cinquerrui S, Mancuso F, Vladislavjević GT, et al. Nanoencapsulation of bacteriophages in liposomes prepared using microfluidic hydrodynamic flow focusing. *Front Microbiol.* 2018;9:2172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02172>
21. Biltonen RL, Lichtenberg D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chem Phys Lipids.* 1993;64(1–3):129–42. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90062-8](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90062-8)
22. Steven AC. Visualization of virus structure in three dimensions. *Methods Cell Biol.* 1981;22:297–323. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61881-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61881-6)
23. Cullis PR, Hope MJ. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies. *Mol Ther.* 2017;25(7):1467–75. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.013>
24. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(3):297–315. PMID: [17717971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17717971/)

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **В.В. Авдеев** – проведение экспериментальных работ (электронная микроскопия, анализ стабильности); валидация методик; анализ данных; участие в интерпретации результатов исследования; оформление иллюстративного материала; критический анализ и доработка текста рукописи; **М.Б. Лапенкова** – разработка и оптимизация методик исследования; проведение экспериментальных работ (приготовление липосомальных форм, определение титра фагов, ПЦР-РВ, измерение дзета-потенциала, хранение образцов); статистическая обработка; визуализация результатов; написание и редактирование текста рукописи; **М.А. Владимирский** – концепция и координация исследования; формулирование целей и задач; разработка методологии исследования; интерпретация полученных данных; написание, критический анализ и доработка текста рукописи; утверждение окончательной 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: **V.V. Avdeev** performed the experiments (electron microscopy, stability analysis of suspensions), validated the techniques, analyzed the data, participated in the interpretation of research results, designed illustrative material, critically analyzed and revised the manuscript; **M.B. Lapenkova** developed and optimized research methods, performed the experiments (preparation of liposomal forms, phage titer test, qPCR, zeta potential measurement, sample storage), processed statistical data, visualized the results, drafted and edited the manuscript; **M.A. Vladimirovsky** conceptualized and coordinated the research, formulated the aim and objectives, developed research methodology, interpreted the data obtained, drafted, analyzed and revised the manuscript, and approved the final version for publication.

## Об авторах / Authors

**Авдеев Вадим Вадимович / Vadim V. Avdeev**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4769-5933>

**Лапенкова Марина Борисовна**, канд. мед. наук / **Marina B. Lapenkova**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8936-4334>

**Владимирский Михаил Александрович**, д-р мед. наук, проф. / **Mikhail A. Vladimirovsky**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2724-5791>

Поступила 04.08.2025

После доработки 05.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Received August 4, 2025

Revised February 5, 2026

Accepted March 13, 2026

УДК 577.21:578.831:57.083.2

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84>

Оригинальная статья | Original article



## Влияние мутаций в местах посадки праймеров на эффективность выявления РНК вируса кори методами ПЦР и LAMP

Г.М. Цыганова<sup>1</sup> , Е.Д. Богословская<sup>2</sup> , Г.А. Шипулин<sup>1</sup> , О.Ю. Шипулина<sup>3</sup> ,  
Е.В. Богословская<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, ул. Погодинская, д. 10, стр. 1, Москва, 119121, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Институтский пер., д. 9, г. Долгопрудный, Московская область, 141701, Российская Федерация

<sup>3</sup> Акционерное общество «ЛабКвест», Бережковская наб., д. 20, стр. 13, Москва, 121059, Российская Федерация

✉ Богословская Елена Владимировна; [Bogoslovskaya@cspfmba.ru](mailto:Bogoslovskaya@cspfmba.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Высокая вариабельность генома РНК-содержащего вируса кори создает риск накопления мутаций в местах посадки (комплементарного связывания) праймеров, что может повлиять на надежность результатов молекулярной диагностики кори. В настоящей работе проведена оценка влияния таких мутаций на эффективность двух молекулярно-генетических методов – ПЦР и метода петлевой изотермической амплификации (LAMP).

**ЦЕЛЬ.** Оценить частоту встречаемости мутаций в местах связывания праймеров и их влияние на эффективность методов ПЦР и LAMP в выявлении РНК вируса кори.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Использовали нуклеотидные последовательности вируса кори из базы данных NCBI и клинические образцы носоглоточного секрета, предоставленные АО «ЛабКвест» (Москва, Россия). Экстракцию РНК вируса кори проводили с использованием набора реагентов «АмплиТест РИБО-преп». Амплификацию выполняли с использованием наборов реагентов «АмплиТест Корь» и методики LAMP. Биоинформатический анализ проводили с использованием программ MAFFT, Jalview 2.1, CD-HIT, MEGA12 и FigTree v.1.4.3.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** При анализе 1080 нуклеотидных последовательностей вируса кори было обнаружено не более одной замены в областях праймеров и зонда, используемых в ПЦР. Анализ последовательностей в местах посадки праймеров, используемых в LAMP, показал большую вариабельность по сравнению с методом ПЦР, но и в этом случае 96,5% последовательностей содержало не более одной мутации в месте посадки каждого праймера. В 15 из 69 клинических образцов была выявлена только одна мутация в области посадки прямого праймера, которая незначительно влияла на эффективность ПЦР при низких концентрациях вируса. Для метода LAMP в 18 образцах было обнаружено три мутации в целевых последовательностях для праймеров F3, V1c и V2. В модельных экспериментах показано, что мисмэтч (несовпадение) во внешнем праймере F3 не влияет на скорость и чувствительность реакции, в то время как для петлевого праймера VIP была показана аномально высокая эффективность амплификации при наличии двух мутаций в РНК-последовательностях, что может косвенно свидетельствовать о наличии конформационных особенностей длинных петлевых праймеров.

**ВЫВОДЫ.** Оба метода – ПЦР и LAMP – эффективно выявляют РНК вируса кори даже при наличии мутаций в области посадки праймеров. Однако метод LAMP требует дальнейшего изучения для широкого внедрения в диагностику кори.






**Ключевые слова:** вирус кори; петлевая изотермическая амплификация; LAMP; полимеразная цепная реакция; ПЦР; мутации; праймеры; диагностика; РНК-вирусы; филогенетический анализ

**Для цитирования:** Цыганова Г.М., Богословская Е.Д., Шипулин Г.А., Шипулина О.Ю., Богословская Е.В. Влияние мутаций в местах посадки праймеров на эффективность выявления РНК вируса кори методами ПЦР и LAMP. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(1):75–84. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках научной деятельности ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России.

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Effect of primer binding sites mutations on the efficacy of measles virus RNA detection using PCR and LAMP techniques

Galina M. Tsyganova<sup>1</sup> , Ekaterina D. Bogoslovskaya<sup>2</sup> , German A. Shipulin<sup>1</sup> , Olga Yu. Shipulina<sup>3</sup> , Elena V. Bogoslovskaya<sup>4</sup> 

<sup>1</sup> Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical and Biological Agency, 10/1 Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (MIPT), 9 Institutsky Ln., Dolgoprudny, Moscow region 141701, Russian Federation

<sup>3</sup> LabQuest, 20/13 Berezhkovskaya Emb., Moscow 121059, Russian Federation

✉ Elena V. Bogoslovskaya; [Bogoslovskaya@cspfmbaru](mailto:Bogoslovskaya@cspfmbaru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** The high variability of the measles virus RNA genome poses risks of mutations accumulating at primer binding sites (complementary binding site), potentially impacting the reliability of molecular measles diagnostics. In this study, we have assessed the impact of such mutations on the efficiency of two molecular genetic methods: PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP).

**AIM.** This study aimed to evaluate the occurrence of mutations at primer binding sites and their impact on the efficiency of PCR and LAMP methods in detecting measles virus RNA.

**MATERIALS AND METHODS.** Clinical samples of nasopharyngeal secretions (LabQuest, Moscow, Russia) and nucleotide sequences from NCBI database were used in the study. AmpliTest RI-BO-prep kit was used for RNA extraction. AmpliTest Measles kit and LAMP-based kit were used for amplification. MAFFT, Jalview 2.1, CD-HIT, MEGA1, and FigTree v.1.4.3 software were used to perform a bioinformatics analysis.

**RESULTS.** Having analyzed 1,080 nucleotide sequences of the measles virus, we found no more than one mutation in the target primers target sites and probe used for PCR. The analyzed LAMP primer binding sites showed greater variability compared to PCR primers; even in this case, 96.5% of the sequences contained no more than a single mutation at each site. Out of 69 clinical samples, only 15 had one mutation in the forward primer binding site, with a minor impact on PCR performance at low virus concentrations. For the LAMP method, three mutations were detected in the F3, B1c, and B2 primer target sites in 18 samples. In a model experiment, the mismatch in the region of the outer primer F3 did not affect the speed and sensitivity of the reaction. Inversely, the loop forming primer BIP performed abnormally well in the presence of two mutations in the RNA sequences. This can indirectly prove the existence of conformational aspects for long loop primers.

**CONCLUSIONS.** Both methods (PCR and LAMP) effectively detect samples with mutations; however, the LAMP method warrants further research to expand its potential for diagnosing measles.

**Keywords:** measles virus; loop-mediated isothermal amplification; LAMP; polymerase chain reaction; PCR; mutations; primers; diagnostics; RNA viruses; phylogenetic analysis

**For citation:** Tsyganova G.M., Bogoslovskaya E.D., Shipulin G.A., Shipulina O.Yu., Bogoslovskaya E.V. Effect of primer binding sites mutations on the efficacy of measles virus RNA detection using PCR and LAMP techniques. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(1):75–84. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84>

**Funding.** The study was performed using scientific results obtained at the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical and Biological Agency.

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Корь остается актуальной проблемой здравоохранения во многих странах, в том числе в Российской Федерации. Важную роль в снижении распространения кори, помимо вакцинации, играет ранняя диагностика. Поскольку иммуноферментный анализ (ИФА) обладает низкой чувствительностью при диагностике на ранних сроках заболевания корью, когда пациент наиболее заразен, необходимы прямые методы выявления вируса [1–3]. Наиболее эффективным из таких методов является полимеразная цепная реакция (ПЦР) благодаря ее высокой чувствительности и специфичности. Метод ПЦР рекомендован Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) для обнаружения вируса кори в продромальный период заболевания и в течение 14 дней после появления сыпи<sup>1</sup>.

В 2024 г. в Российской Федерации были обновлены клинические рекомендации по ведению больных корью, включившие метод ПЦР с целью идентификации вируса кори и подтверждения диагноза у всех пациентов с подозрением на коревую инфекцию (подозрительный или вероятный случай), а также у детей, рожденных от матерей, переболевших корью в третьем триместре беременности<sup>2</sup>. Единственным зарегистрированным в России (2022 г.) набором для молекулярной диагностики кори является «АмплиТест Корь». Позднее в ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России) был разработан набор реагентов на основе метода петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) для выявления РНК вируса кори, обладающий аналитическими характеристиками, не уступающими зарегистрированному набору на основе ПЦР, и значительно превосходящий его по скорости анализа [4].

Однако методы изотермической амплификации до сих пор не получили широкого распространения в клинической практике. Это связано с новизной

метода и малым количеством работ, демонстрирующих его эффективность в выявлении высоковариабельных матриц. Несмотря на активное применение LAMP во время пандемии SARS-CoV-2 [5], необходимость использования как минимум 6 праймеров ограничивает его использование для выявления вариабельных вирусов [6].

В случае вариабельных вирусов полная комплементарность между нуклеотидными последовательностями праймеров и матрицей практически недостижима независимо от метода амплификации. Возникающие несоответствия могут приводить к снижению чувствительности анализа вплоть до получения ложноотрицательных результатов. Влияние мутаций на эффективность ПЦР было многократно показано для различных матриц [7, 8], в том числе в наших исследованиях [9]. В то же время работ, демонстрирующих влияние мутаций в местах посадки праймеров на эффективность LAMP, крайне мало.

Цель работы – оценить частоту встречаемости мутаций в местах связывания праймеров и их влияние на эффективность методов ПЦР и LAMP в выявлении РНК вируса кори.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Клинический материал*

Были исследованы 69 клинических образцов носоглоточного секрета, полученных в 2024 г. из лабораторий АО «ЛабКвест» (Москва, Россия), в которые образцы поступали из различных клиник Российской Федерации. Все образцы имели положительные результаты на наличие в них РНК вируса кори, полученные с использованием набора реагентов «АмплиТест Корь» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России).

### *Экстракция РНК вируса кори из клинических образцов*

Экстракцию РНК вируса кори проводили с использованием набора реагентов «АмплиТест РИБО-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России).

### *Амплификация*

ПЦР, совмещенную с обратной транскрипцией, проводили с помощью набора реагентов

<sup>1</sup> Surveillance guidelines for measles, rubella and congenital rubella syndrome in the WHO European Region. Update December 2012. WHO Regional Office for Europe; 2012.

<sup>2</sup> Клинические рекомендации (утв. Министерством здравоохранения Российской Федерации). 2024.

«АмплиТест Корь» согласно инструкции производителя. Реакцию LAMP, совмещенную с обратной транскрипцией, выполняли с использованием методики, описанной ранее [4]. Амплификацию экстрагированных образцов проводили с помощью прибора Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия).

#### **Секвенирование**

Для выявления мутаций в местах связывания праймеров с матрицей все клинические образцы секвенировали по Сэнгеру с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, США) и генетического анализатора Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США). Использовали пару праймеров, ограничивающих область ампликации вируса кори обоими методами (ПЦР и LAMP): tagtyggtgaatttagattggag и saaaagtaagatcgaccraagttc (длина ампликона 458 п.н.). Дополнительно полученные нуклеотидные последовательности использовали для генотипирования вируса кори.

#### **Базы данных и биоинформатический анализ**

Из базы данных Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI)<sup>3</sup> были выгружены все последовательности гена N вируса кори (15476 последовательностей на конец апреля 2025 г.). Проводили множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей с помощью программы MAFFT<sup>4</sup>. Выравнивание обрезали по области праймеров, используемых для секвенирования по Сэнгеру, с использованием программы Jalview 2.1<sup>5</sup> и повторно выравнивали (MAFFT), удаляя пустые и неполные последовательности. В итоге было получено 1080 последовательностей, содержащих область ампликации РНК вируса кори двумя методами (ПЦР и LAMP).

Для анализа каждого праймера выравнивание обрезали по области того или иного праймера или зонда. Кластеризацию последовательностей каждого праймера проводили с помощью программы CD-HIT-v4.8.1-2019-0228<sup>6</sup> (порог идентичности – 100%). Кластеры ранжировали по числу включенных в них представителей в порядке убывания. Кластеры с одной последовательностью исключали. Если олигонуклеотид содержал инозин или вырожденный нуклеотид,

то такая позиция не считалась мисмэтчем (несоответствием, несопадением).

Для построения филогенетического дерева полученное в MAFFT выравнивание 15476 последовательностей обрезали справа по 1596 нуклеотиду полногеномной последовательности, а слева по 721 нуклеотиду (граница левого праймера, используемого для секвенирования). Последовательности короче заданного порога исключали из анализа. В итоге осталось 1078 последовательностей, включающих области, фланкированные диагностическими праймерами, и регион N-гена, рекомендуемый для генотипирования вируса кори [10, 11]. Для уменьшения числа последовательностей проводили кластеризацию с идентичностью 98% с использованием программы CD-HIT-v4.8.1-2019-0228, получив 42 кластера. К ним добавили референсные последовательности 24 известных генотипов вируса кори [12]. После выравнивания и обрезки по наименьшей длине последовательности был получен фрагмент длиной 455 нуклеотидов (с 1142 по 1596 нуклеотид полногеномной последовательности, рекомендуемый для генотипирования вируса кори). Филогенетическое дерево строили для указанного фрагмента с использованием программы MEGA12<sup>7</sup> и алгоритма Neighbor-Joining и Bootstrap анализа (500 повторов). Визуализацию дерева, включая отображение значений Bootstrap (%) и выделение референсных последовательностей, проводили при помощи программы FigTree v.1.4.3<sup>8</sup>.

Для генотипирования клинических образцов использовали программу Nextclade v3.18.0<sup>9</sup>.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Оценка репрезентативности выборки**

Для оценки репрезентативности выборки проанализированных нами нуклеотидных последовательностей генома вируса кори из базы данных NCBI был проведен анализ их генотипической принадлежности и актуальности. Филогенетический анализ (рис. S1, опубликован на сайте журнала<sup>10</sup>) показал равномерное распределение последовательностей по всем известным генотипам, включая актуальные (выявленные за последние 12 мес. на момент последнего обновления номенклатуры 20.05.2015 [12]).

<sup>3</sup> GenBank. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

<sup>4</sup> <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/large.html>

<sup>5</sup> [https://www-test.jalview.org/development/archive/Version-2\\_1/](https://www-test.jalview.org/development/archive/Version-2_1/)

<sup>6</sup> [https://usegalaxy.eu/?tool\\_id=cd\\_hit](https://usegalaxy.eu/?tool_id=cd_hit)

<sup>7</sup> <https://www.megasoftware.net/>

<sup>8</sup> [https://www.researchgate.net/figure/FigTree-v143-http-treebioedacuk-software-figtree-Phylogenetic-analysis-of-E1\\_fig1\\_353848815](https://www.researchgate.net/figure/FigTree-v143-http-treebioedacuk-software-figtree-Phylogenetic-analysis-of-E1_fig1_353848815)

<sup>9</sup> <https://clades.nextstrain.org/>

<sup>10</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s1>

### **Частота встречаемости и расположение мутаций в местах посадки праймеров и зонда для методов LAMP и ПЦР**

В результате анализа 1080 нуклеотидных последовательностей генома вируса кори были получены данные по частоте встречаемости и положению мутаций для каждого праймера.

Согласно полученным данным для праймеров и зонда, используемых в ПЦР (*рис. S2*, опубликован на сайте журнала<sup>11</sup>), 85,5% последовательностей полностью комплементарны прямому праймеру, 88% – обратному праймеру и 98,8% – зонду. Более одной замены в областях прямого, обратного праймера или зонда обнаружено не было. Мутации в большинстве случаев значительно отстоят от 3'-конца праймера и 5'-конца зонда (*рис. 2*). Наиболее близко к 3'-концу прямого праймера расположены мутации в кластерах 2 и 4, а обратного – в кластерах 1 и 3. Для зонда абсолютное большинство последовательностей являются консервативными.

Для праймеров, используемых в LAMP (*рис. S3*, опубликован на сайте журнала<sup>12</sup>), была показана большая вариабельность в местах посадки праймеров по сравнению с методом ПЦР. Однако подавляющее большинство последовательностей не имело мутаций или имело только одну мутацию в местах посадки праймеров. Для внешних праймеров F3 и B3 99,4 и 99,3% последовательностей соответственно консервативны области выбранных праймеров или содержали только одну мутацию. Праймеры FIP (прямой внутренний праймер) и VIP (обратный внутренний праймер) имеют по два сайта связывания с матрицей (F1c и F2, B1c и B2 соответственно). Они взаимодействуют с противоположными цепями ДНК и поэтому оценивались как два отдельных олигонуклеотида. Праймеры FIP и VIP показали высокую консервативность: для областей F1c и F2 праймера FIP – 99,3 и 99,5%, а для областей B1c и B2 праймера VIP – 96,5 и 99,7% последовательностей были полностью консервативны выбранным праймерам либо имели всего одну замену. Петлевые праймеры LF (прямой петлевой праймер) и LB (обратный петлевой праймер) также высоко консервативны: 99,5% последовательностей для LF и 96,7% последовательностей для LB имели не более одной замены.

### **Частота встречаемости мутаций в нуклеотидных последовательностях вируса кори, выделенных из клинических образцов**

Анализ 69 клинических образцов с использованием разработанного набора на основе

метода LAMP и набора реагентов на основе ПЦР («АмплиТест Корь») показал высокую сходимость результатов (98,6%), что согласуется с нашими предыдущими данными [4]. Один образец был отрицательным в обоих тестах и один образец – отрицательным при использовании LAMP и положительным (Ct 30,52) в ПЦР.

После секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей с помощью программы CD-HIT с порогом идентичности 100% все образцы разделили на 5 кластеров. Используемые нами праймеры для секвенирования охватывают общую область расположения праймеров для обоих методов (нуклеотиды 721–1179 полногеномной последовательности). По данным программы Nextclade v3.18.0, один кластер был отнесен к генотипу B3 (18 образцов – 26,5% от всех изученных изолятов), остальные 4 кластера – к генотипу D8.

Детальный анализ по каждому олигонуклеотиду, входящему в состав реакционной смеси ПЦР, выявил только одну мутацию для прямого праймера ПЦР в 23 положении относительно 3'-конца, что соответствует кластеру 3 на *рисунке S2*. Для олигонуклеотидов, используемых в LAMP, было выявлено по одной мутации в трех из восьми анализируемых фрагментах (*табл. 1*), все они соответствовали кластерам 1 и 2 на *рисунке S2*.

### **Оценка влияния мутаций в местах посадки праймеров на чувствительность методов LAMP и ПЦР для обнаружения РНК вируса кори**

Для оценки влияния мутаций на чувствительность методов были отобраны 3 образца с мутациями в местах посадки праймеров для LAMP (образцы 18а, 31а и 32а, по 3 мутации в каждом образце, *табл. 2*) и 3 образца с мутациями в местах посадки праймеров для ПЦР (образцы 19а, 22а и 30а, 1 мутация в прямом праймере в каждом образце, *табл. 3*). При этом образцы с мутациями в местах посадки праймеров LAMP не имели мутаций в местах посадки праймеров, используемых в ПЦР, и наоборот. Тестирование 10-кратных разведений РНК, выделенных из этих образцов (*табл. 2, 3*), показало большую чувствительность метода ПЦР по сравнению с методом LAMP. Число разведений РНК, прошедших в исследовании как положительные, в ПЦР было больше на 1–2 порядка, чем в LAMP, даже при наличии мутаций в местах посадки праймеров, что согласуется с ранее полученными данными [4, 13, 14].

Для изучения влияния выявленных мутаций на чувствительность обоих методов все представленные в *таблице 1* мутации были внесены

<sup>11</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s2>

<sup>12</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s3>

**Таблица 1.** Мутации в местах посадки праймеров и зонда, выявленные в нуклеотидных последовательностях вируса кори, выделенных из клинических образцов**Table 1.** Mutations in primers and probe sites identified in the nucleotide sequences of measles virus isolated from clinical samples

Метод <i>Method</i>	Последовательность праймера <i>Primer sequence</i>	Тип несоответствия <i>Mismatch type</i>	Расстояние от 3'-конца праймера <i>Distance from 3'-end primer</i>	% последовательностей <i>% of sequences</i>	Количество образцов <i>Samples count</i>	Кластер <i>Cluster</i>
ПЦР <i>PCR</i>	Прямой праймер / <i>Forward primer</i> ctgacyattaagtttgagatagara	-	-	77,9	53	-
		G→A	23	22,1	15	3
	Обратный праймер / <i>Backward primer</i> tatcmacacttgagtcctygtg	-	-	100	68	-
	Зонд / <i>Probe</i> atgtaucctgctctyggactgcatg	-	-	100	68	-
LAMP	Прямой праймер / <i>Forward primer</i> F3: ccgaaatgatatgygacattga	-	-	73,5	50	-
		C→T	21	26,5	18	1
	Обратный праймер / <i>Backward primer</i> B3: gagaactcaattcagaacaag	-	-	100	68	-
	Обратный праймер / <i>Backward primer</i> FIP(F1c): tcttgactgcatgaatttc	-	-	100	68	-
	Прямой праймер / <i>Forward primer</i> FIP(F2): ggcaggaytagccagt	-	-	100	68	-
	Прямой праймер / <i>Forward primer</i> BIP(B1c): ggtgagttatccacacttgatc	-	-	73,5	50	-
		G→A	18	26,5	18	1
	Обратный праймер / <i>Backward primer</i> BIP(B2): gaaactgcaccctayatg	-	-	73,5	50	-
		A→G	3	26,5	18	2
Обратный праймер / <i>Backward primer</i> LF: tggatagaaactatgtaucctgc	-	-	100	68	-	
Прямой праймер / <i>Forward primer</i> LB: tgatgaatctttaccagcaaatg	-	-	100	68	-	

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

*Примечание.* LAMP – петлевая изотермическая амплификация; «-» отсутствие мутаций в месте посадки праймеров или зонда.  
*Note.* LAMP, loop-mediated isothermal amplification; -, no mutations in primer binding sites or probe.

в последовательности праймеров (один праймер для ПЦР и четыре для LAMP) таким образом, чтобы новые праймеры стали полностью или частично комплементарны последовательностям с мутациями. Последующее тестирование 10-кратных разведений РНК шести ранее отобранных образцов с мутациями проводили для оценки влияния мутаций на скорость и чувствительность ПЦР и LAMP. Использовали смеси со стандартными праймерами из наборов реагентов (смесь А) и с модифицированными праймерами (смеси В, С, D, F, G) (табл. 4).

В ПЦР (табл. 5) использование смеси В с модифицированным праймером увеличило число разведений РНК, прошедших в исследовании как положительные, на порядок для одного из трех образцов, а для двух других различий не было выявлено. При этом для предельных разведений с положительным результатом наблюдалось наибольшее отставание по пороговым циклам в случае мисмэтча, что может указывать на снижение чувствительности метода при тестировании низких концентраций вируса.

В LAMP (табл. 6) праймер F3 (смесь С) практически не оказывал влияние на скорость реакции. При использовании праймера BIP с мутацией только в сайте B1c (смесь F) разницы в скорости реакции и чувствительности также не наблюдалось. Неожиданные результаты были получены при использовании праймера BIP с одной мутацией в сайте B2 (смесь G) и с двумя внесенными мутациями (смесь D): в обоих случаях праймеры сработали аномально хуже, приведя к уменьшению чувствительности и скорости реакции, несмотря на то что праймер с двумя мутациями был полностью комплементарен исследуемому образцу.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-генетические методы (ПЦР и LAMP) играют важную роль в ранней диагностике кори, когда пациент наиболее заразен, а ИФА малоинформативен [2, 15, 16]. Основным фактором при разработке молекулярно-генетических методик для выявления РНК вируса кори является консервативность области генома вируса, на которую направлены диагностические

**Таблица 2.** Результаты ПЦР и LAMP при тестировании 10-кратных разведений РНК вируса кори с мутациями в местах связывания праймеров для метода LAMP

**Table 2.** PCR and LAMP results for 10-fold dilutions of measles virus RNA with mismatches in LAMP primer binding sites

Разведение <i>Dilution</i>	Образцы с мутациями в местах связывания праймеров LAMP <i>Samples with mutations in LAMP primers binding sites</i>					
	18a		31a		32a	
	LAMP, Ct	ПЦР, Ct / PCR, Ct	LAMP, Ct	ПЦР, Ct / PCR, Ct	LAMP, Ct	ПЦР, Ct / PCR, Ct
10 <sup>-1</sup>	8,31	20,21	8,25	20,14	12,28	24,31
10 <sup>-2</sup>	10,37	23,79	10,51	23,80	22,87	28,43
10 <sup>-3</sup>	17,25	27,91	21,01	28,22	Отриц. / <i>Neg.</i>	32,62
10 <sup>-4</sup>	19,46	31,89	Отриц. / <i>Neg.</i>	31,33	Отриц. / <i>Neg.</i>	33,84
10 <sup>-5</sup>	Отриц. / <i>Neg.</i>	33,35	Отриц. / <i>Neg.</i>	34,39	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>

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

*Примечание.* LAMP – петлевая изотермическая амплификация; Ct – пороговый цикл; отриц. – значение Ct не определено.  
*Note.* LAMP, loop-mediated isothermal amplification; Ct, threshold cycle; neg., threshold cycle not determined.

**Таблица 3.** Результаты ПЦР и LAMP при тестировании 10-кратных разведений РНК вируса кори с мутациями в местах связывания праймеров для метода ПЦР

**Table 2.** PCR and LAMP results for 10-fold dilutions of measles virus RNA with mismatches in PCR primer binding sites

Разведение <i>Dilution</i>	Образцы с мутациями в местах связывания праймеров ПЦР <i>Samples with mismatches in PCR primer binding sites</i>					
	19a		22a		30a	
	LAMP, Ct	ПЦР, Ct / PCR, Ct	LAMP, Ct	ПЦР, Ct / PCR, Ct	LAMP, Ct	ПЦР, Ct / PCR, Ct
10 <sup>-1</sup>	4,91	19,18	20,13	20,14	6,33	23,36
10 <sup>-2</sup>	6,27	22,82	24,24	23,80	7,49	27,15
10 <sup>-3</sup>	9,66	27,52	28,32	28,22	11,21	31,63
10 <sup>-4</sup>	17,88	31,15	32,00	31,33	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>
10 <sup>-5</sup>	Отриц. / <i>Neg.</i>	35,12	Отриц. / <i>Neg.</i>	34,39	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>

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

*Примечание.* LAMP – петлевая изотермическая амплификация; Ct – пороговый цикл; отриц. – значение Ct не определено.  
*Note.* LAMP, loop-mediated isothermal amplification; Ct, threshold cycle; neg., threshold cycle not determined.

**Таблица 4.** Праймеры, используемые в реакционных смесях для LAMP и ПЦР

**Table 4.** Primers for LAMP and PCR mixes

Смесь <i>Mix</i>	Праймер <i>Primer</i>	5'-3'-последовательность <i>5'-3'-sequence</i>	Метод <i>Method</i>
B	Forward mut	ctaacyattaagtttgggtagara	ПЦР/ PCR  LAMP
C	F3 mut	ctgaaatgatatgyacattga	
D	BIP mut	ggtgaattatccacacttgagcttttcatrtagggtgcagtc	
F	MIBIPmod1	ggtgaattatccacacttgagcttttcatrtagggtgcagtttc	
G	MIBIPmod2	ggtgagttatccacacttgagcttttcatrtagggtgcagtc	

Таблица составлена авторами / The table was prepared by the authors

*Примечание.* LAMP – петлевая изотермическая амплификация. Жирным шрифтом выделены внесенные в праймеры мутации, выявленные в клинических образцах.

*Note.* LAMP, loop-mediated isothermal amplification. Mutations introduced in the primers and identified in clinical samples are highlighted in bold.

олигонуклеотиды. Несмотря на относительно высокую генетическую стабильность вируса кори (скорость накопления мутаций (3,4–9,02)×10<sup>-4</sup> замен/основание/год [17]) по сравнению с другими РНК-вирусами, выбор матрицы для праймеров имеет решающее значение для обеспечения высокой чувствительности и специфичности

анализа. В качестве матрицы для обоих методов (ПЦР и LAMP) нами был выбран ген внутреннего структурного белка нуклеопротеина (N-ген), сочетающий достаточную консервативность с высоким уровнем транскрипции [18].

Тем не менее несоответствия между праймером и матрицей неизбежны независимо

от используемой методики. Любое несовпадение в последовательности праймера снижает термическую стабильность дуплекса праймера и матрицы и может влиять на чувствительность ПЦР или LAMP.

В настоящей работе мы оценили частоту встречаемости мутаций в местах посадки праймеров и зонда, используемых в наборах реагентов на основе LAMP и ПЦР для выявления РНК вируса кори. В отличие от нашего предыдущего исследования, в котором было

проанализировано 696 полногеномных нуклеотидных последовательностей вируса кори [4], в настоящей работе были изучены все последовательности, представленные в базе данных NCBI, что почти вдвое увеличило объем выборки. Филогенетический анализ этих образцов показал, что выборка включает все генотипы вируса кори, в том числе актуальные.

Согласно полученным данным, более 99% последовательностей полностью комплементарны праймерам, используемым в ПЦР, или имеют

**Таблица 5.** Результаты ПЦР для 10-кратных разведений РНК вируса кори с мутациями в местах посадки праймеров  
**Table 5.** PCR results for 10-fold dilutions of measles virus RNA with mutations in primer binding sites

Разведение образца <i>Sample dilution</i>	ПЦР, Ct / <i>PCR, Ct</i>					
	Образец 22а / <i>Sample 22a</i>		Образец 19а / <i>Sample 19a</i>		Образец 30а / <i>Sample 30a</i>	
	Смесь А / <i>Mix A</i>	Смесь В / <i>Mix B</i>	Смесь А / <i>Mix A</i>	Смесь В / <i>Mix B</i>	Смесь А / <i>Mix A</i>	Смесь В / <i>Mix B</i>
10 <sup>-1</sup>	21,68	20,46	20,72	19,23	25,61	24,08
10 <sup>-2</sup>	27,88	26,00	25,78	24,23	31,81	29,12
10 <sup>-3</sup>	35,34	32,08	33,03	29,78	Отриц. / <i>Neg.</i>	35,70
10 <sup>-4</sup>	40,51	36,61	38,16	34,32	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>
10 <sup>-5</sup>	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>

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

*Примечание.* Ct – пороговый цикл; отриц. – значение Ct не определено. А – реакционная смесь со стандартными праймерами из набора реагентов; В – реакционная смесь с модифицированными праймерами.

*Note.* Ct, threshold cycle; neg., threshold cycle not determined. A, standard mix with primers from the reagent kit; B, mix with modified primers.

**Таблица 6.** Результаты LAMP для 10-кратных разведений РНК вируса кори с мутациями в местах посадки праймеров  
**Table 6.** LAMP results for 10-fold dilutions of measles virus RNA with mismatches in primer binding sites

Разведение образца <i>Sample dilution</i>	LAMP, Ct				
	Образец 18а / <i>Sample 18a</i>				
	Смесь А / <i>Mix A</i>	Смесь С / <i>Mix C</i>	Смесь D / <i>Mix D</i>	Смесь F / <i>Mix F</i>	Смесь G / <i>Mix G</i>
10 <sup>-1</sup>	11,22	13,33	30,03	11,18	32,44
10 <sup>-2</sup>	13,10	21,15	36,76	14,53	Отриц.
10 <sup>-3</sup>	14,72	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>
Образец 31а / <i>Sample 31a</i>					
10 <sup>-1</sup>	11,55	13,59	29,6	11,34	32,49
10 <sup>-2</sup>	13,40	20,15	35,56	14,62	36,76
10 <sup>-3</sup>	26,35	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>	36,76	Отриц. / <i>Neg.</i>
Образец 32а / <i>Sample 32a</i>					
10 <sup>-1</sup>	14,02	14,02	34,69	14,87	38,01
10 <sup>-2</sup>	21,67	16,46	Отриц. / <i>Neg.</i>	22,29	Отриц. / <i>Neg.</i>
10 <sup>-3</sup>	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>	Отриц. / <i>Neg.</i>

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

*Примечание.* LAMP – петлевая изотермическая амплификация; Ct – пороговый цикл; отриц. – значение Ct не определено. А – реакционная смесь со стандартными праймерами из набора реагентов; С, D, F, G – реакционные смеси с модифицированными праймерами.

*Note.* LAMP, loop-mediated isothermal amplification; Ct, threshold cycle; neg., samples threshold cycle not determined. A, standard mix with primers from the reagent kit; C, D, F, G, mixes with modified primers.

только одну замену в местах их посадки. Для LAMP была показана чуть большая вариабельность в области посадки праймеров: 96,5% последовательностей, представленных в базе данных NCBI, комплементарны праймерам или содержат единичные мутации. Таким образом, нам удалось выбрать не только максимально консервативную область в гене нуклеопротеина (919–1008 – для ПЦР, 860–1071 – для LAMP), но и подобрать праймеры, которые могут эффективно выявлять РНК вируса кори в клинических образцах обоими методами, независимо от генотипа.

Анализ последовательностей вируса кори, полученных из клинических образцов от пациентов в Российской Федерации, показал наличие одной мутации в области посадки прямого праймера для ПЦР и по одной мутации в областях праймеров F3 и VIP (B1c и B2) для LAMP. В модельных экспериментах было показано небольшое снижение чувствительности ПЦР в случае единичной мутации при крайне низких концентрациях вируса. Несмотря на расположение мутации в прямом праймере достаточно далеко от 3'-конца праймера (23-е положение), в крайних разведениях РНК наблюдалось отставание примерно на 4 цикла, где эта мутация присутствовала, а для одного из трех образцов число разведений РНК с положительным результатом было на одно больше при использовании полностью комплементарного прямого праймера.

В случае использования метода LAMP для выявления РНК вируса кори нами установлено, что замены во внешних праймерах

F3 и B3, используемых для инициации реакции, не влияют на скорость и чувствительность реакции, что согласуется с данными литературы [19]. В отличие от внешних праймеров, петлевой праймер VIP внес гораздо больший вклад в реакцию. Механизм этого влияния остается неясным, поскольку праймер с двумя внесенными мутациями и полностью комплементарный РНК вируса кори сработал аномально хуже, чем праймер с двумя мисмэтчами к этим РНК-последовательностям, приводя к уменьшению скорости реакции, но не к снижению чувствительности анализа. Негативное влияние на реакцию оказывала только замена в сайте B2 праймера VIP, тогда как замена в сайте B1c не влияла на ее скорость. Это может косвенно указывать на наличие конформационных особенностей длинных петлевых праймеров, негативно влияющих на скорость реакции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-генетические методы – ПЦР и LAMP – эффективно выявляют РНК вируса кори в клинических образцах независимо от генотипа. При использовании метода ПЦР в большинстве случаев одиночные мутации мало влияли на эффективность амплификации, что согласуется с нашими предыдущими данными по диагностике ВИЧ. В случае LAMP одиночные мутации также в большинстве случаев не влияли на чувствительность анализа, однако влияние структуры петлевых праймеров на скорость реакции требует дальнейшего изучения.

## Литература/References

- Cui A, Mao N, Wang H, et al. Importance of real-time RT-PCR to supplement the laboratory diagnosis in the measles elimination program in China. *PLoS One*. 2018;13(11):e0208161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208161>
- Ma R, Lu L, Suo L, et al. Evaluation of the adequacy of measles laboratory diagnostic tests in the era of accelerating measles elimination in Beijing, China. *Vaccine*. 2019;37(29):3804–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.058>
- Woo G, Wong AH, Lee WY, et al. Comparison of laboratory diagnostic methods for measles infection and identification of measles virus genotypes in Hong Kong. *J Med Virol*. 2010;82(10):1773–81. <https://doi.org/10.1002/jmv.21888>
- Цыганова ГМ, Носова АО, Шипулина ОЮ и др. Разработка первого российского LAMP-набора для диагностики кори. *Лабораторная служба*. 2024;13(4):28–35. Tsyganova GM, Nosova AO, Shipulina OYu, et al. Development of a first LAMP kit for measles diagnostics. *Laboratory Service*. 2024;13(4):28–35 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/labs20241304128>
- Thompson D, Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sens Actuators Rep*. 2020;2(1):100017. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2020.100017>
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):e63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Stadhouders R, Pas SD, Anber J, et al. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagn*. 2010;12(1):109–17. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090035>
- Zimmermann F, Urban M, Krüger C, et al. In vitro evaluation of the effect of mutations in primer binding sites on detection of SARS-CoV-2 by RT-qPCR. *J Virol Methods*. 2022;299:114352. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114352>
- Bogoslovskaya EV, Tsyganova GM, Nosova AO, Shipulin GA. Analysis of the frequency of mutations at diagnostic oligonucleotide sites and their impact on the efficiency of PCR for HIV1. *Microorganisms*. 2023;11(12):2838. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122838>
- Measles virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol Rec*. 2012;87(9):73–81.
- Expanded Programme on Immunization (EPI). Standardization of the nomenclature for describing the genetic char-

- acteristics of wild-type measles viruses. *Wkly Epidemiol Rec.* 1998;73(35):265–9.
12. Genetic diversity of wild-type measles viruses and the global measles nucleotide surveillance database (MeaNS). *Wkly Epidemiol Rec.* 2015;90(30):373–80.
  13. Choi G, Moehling TJ, Meagher RJ. Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2023;23(1):9–28. <https://doi.org/10.1080/14737159.2023.2169071>
  14. Tapia-Sidas DA, Vargas-Hernández BY, Ramírez-Pool JA, et al. Starting from scratch: Step-by-step development of diagnostic tests for SARS-CoV-2 detection by RT-LAMP. *PLoS One.* 2023;18(1):e0279681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279681>
  15. Носова АО, Богословская ЕВ, Шипулин ГА. Современные подходы и перспективы развития лабораторной диагностики кори. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2023;25(1):4–12. Nosova AO, Bogoslovskaya EV, Shipulin GA. Current approaches and prospects for the development of laboratory diagnosis of measles. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2023;25(1):4–12 (In Russ.). <https://doi.org/10.36488/cmacc.2023.1.4-12>
  16. Tipples GA, Hamkar R, Mohktari-Azad T, et al. Assessment of immunoglobulin M enzyme immunoassays for diagnosis of measles. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4790–2. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4790-4792.2003>
  17. Beaty SM, Lee B. Constraints on the genetic and antigenic variability of measles virus. *Viruses.* 2016;8(4):109. <https://doi.org/10.3390/v8040109>
  18. Schneider-Schaulies S, Liebert UG, Baczko K, et al. Restriction of measles virus gene expression in acute and subacute encephalitis of Lewis rats. *Virology.* 1989;171(2):525–34. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90622-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90622-3)
  19. Tamanaha E, Zhang Y, Tanner NA. Profiling RT-LAMP tolerance of sequence variation for SARS-CoV-2 RNA detection. *PLoS One.* 2022;17(3):e0259610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259610>

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены рисунки S1–S3.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s2>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s3>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Г.М. Цыганова** — планирование и проведение экспериментальной части работы с клиническим материалом, обработка данных, анализ результатов, написание текста рукописи; **Е.Д. Богословская** — работа с базами данных, биоинформатический анализ; **Г.А. Шипулин** — дизайн исследования, редактирование текста рукописи; **О.Ю. Шипулина** — сбор клинического материала; **Е.В. Богословская** — дизайн исследования, формулировка выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

**Additional information.** Figures S1–S3 are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.*

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s2>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-75-84-fig-s3>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **G.M. Tsyganova** performed the experiments, processed data, analysed the results, and drafted the manuscript. **E.D. Bogoslovskaya** processed databases and performed bioinformatics analysis. **G.A. Shipulin** designed the study and edited the article. **O.Yu. Shipulina** performed the experiments. **E.V. Bogoslovskaya** designed the study, formulated the conclusions and approved the final version for publication.

## Об авторах / Authors

**Цыганова Галина Михайловна / Galina M. Tsyganova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1527-949X>

**Богословская Екатерина Денисовна / Ekaterina D. Bogoslovskaya**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-9891-2565>

**Шипулин Герман Александрович, канд. мед. наук / German A. Shipulin, Cand. Sci. (Med.)**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3668-6601>

**Шипулина Ольга Юрьевна, канд. мед. наук / Olga Yu. Shipulina, Cand. Sci. (Med.)**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4679-6772>

**Богословская Елена Владимировна, д-р мед. наук / Elena V. Bogoslovskaya, Dr. Sci. (Med.)**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3250-6498>

Поступила 03.10.2025

После доработки 05.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Received October 3, 2025

Revised February 5, 2026

Accepted March 13, 2026







УДК 606:615.076

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96>

Оригинальная статья | Original article



## Оценка активности филграстима биологическим методом *in vitro*: валидация методики

Л.А. Гайдерова , М.Л. Байкова , О.В. Головинская , С.Л. Лыскова ,  
В.В. Фоменко , Н.А. Алпатова ✉

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

✉ Алпатова Наталья Александровна; [alpatova@expmed.ru](mailto:alpatova@expmed.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Филграстим представляет собой гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека, изготовленный по технологии рекомбинантных ДНК. Поскольку при производственном контроле качества филграстима должна применяться валидированная методика, первостепенное значение имеет установление ее валидационных характеристик методики в полном объеме, а при замене критичных реагентов/материалов/параметров – подтверждение ранее установленных.

**ЦЕЛЬ.** Выбор параметров и подтверждение ряда валидационных характеристик методики оценки специфической активности филграстима биологическим методом *in vitro* при использовании клеточной линии NFS-60.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Специфическую активность филграстима оценивали по интенсивности флуоресценции красителя alamarBlue™ при длинах волн возбуждения (530 нм) и эмиссии (620 нм), прямо пропорциональной уровню пролиферации клеток линии NFS-60 под действием филграстима в дозах от 0,1 до 208 МЕ/мл. Полученные данные анализировали в программе PLA 2.0.0 методом параллельных линий с использованием 4-параметрической логистической функции 4PL.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Методика охарактеризована как прецизионная: значение коэффициента вариации (CV) при изучении повторяемости и внутрилабораторной прецизионности составляет 6,20 и 1,19% соответственно (критерий приемлемости  $CV \leq 25\%$ ). Методика линейна – коэффициент детерминации ( $R^2$ ) линейной функции составляет 0,99 при значении критерия приемлемости  $R^2 \geq 0,95$ . Значение степени извлечения составляет 101,6% и не превышает отклонения  $\pm 10\%$  от ожидаемого значения. Методика устойчива к увеличению плотности клеточной суспензии с  $1,5 \times 10^5$  до  $3,0 \times 10^5$  клеток/мл ( $CV=0,07\%$ ) и увеличению продолжительности инкубации образцов филграстима с клеточной суспензией с 48 до 72 ч ( $CV=4,2\%$ ) или с флуоресцентным красителем с 4 до 6 ч ( $CV=2,05\%$ ).

**ВЫВОДЫ.** Методика оценки специфической активности препаратов на основе филграстима в условиях *in vitro* при использовании клеток линии NFS-60 характеризуется линейностью, прецизионностью и правильностью; показана устойчивость методики при контролируемом изменении ряда параметров. Исследование подтверждает пригодность использования клеток линии NFS-60 при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима. Это имеет важное значение для производителей с точки зрения расширения спектра клеточных линий, применяемых при оценке качества препаратов.

**Ключевые слова:** специфическая активность; биологический метод; валидационные характеристики; правильность; линейность; робастность; прецизионность; линия клеток NFS-60; гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

© Л.А. Гайдерова, М.Л. Байкова, О.В. Головинская, С.Л. Лыскова, В.В. Фоменко, Н.А. Алпатова, 2026  
Издатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

**Для цитирования:** Гайдерова Л.А., Байкова М.Л., Головинская О.В., Лысикова С.Л., Фоменко В.В., Алпатова Н.А. Оценка активности филграстима биологическим методом *in vitro*: валидация методики. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(1):85–96. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00061-26-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).  
**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Validation of an *in vitro* biological method for filgrastim potency assessment

Lidia A. Gaiderova , Marina L. Baykova , Olga V. Golovinskaya ,  
Svetlana L. Lysikova , Viktoriia V. Fomenko , Natalia A. Alpatova  

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

✉ Natalia A. Alpatova; [alpatova@expmed.ru](mailto:alpatova@expmed.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Filgrastim is a human granulocyte colony-stimulating factor produced using recombinant DNA technology. Since filgrastim quality control necessitates a validated method, establishing the entire method validation parameters is of high priority; confirming the previously established parameters gains primary importance when substituting critical reagents/materials/parameters.

**AIM.** This study aimed to select and confirm a number of validation parameters for *in vitro* biological method that would assess filgrastim potency using NFS-60 cell line.

**MATERIALS AND METHODS.** Filgrastim potency was assessed by fluorescence intensity of alamarBlue™ reagent at excitation wavelengths of 530 nm and emission of 620 nm directly proportional to proliferation level of NFS-60 cells exposed to filgrastim 0.1 to 208 IU/mL. Statistical analysis of the results was performed using the 4-parameter logistic function 4PL and the parallel line analysis in PLA 2.0.0 software.

**RESULTS.** The method was deemed precise: the coefficient of variation (CV) in the repeatability study was 6.20%, and the intermediate precision study showed CV 1.19% (acceptance criterion  $CV \leq 25\%$ ). The method was linear; the coefficient of determination for the linear function was  $R^2 = 0.99$  (acceptance criterion  $R^2 \geq 0.95$ ). The degree of recovery was 101.6% and did not exceed  $\pm 10\%$  of the expected value. The method was robust to an increased density of the cell suspension from  $1.5 \times 10^5$  to  $3.0 \times 10^5$  cells/mL ( $CV = 0.07\%$ ) and to prolonged incubation of filgrastim samples with the cell suspension (from 48 to 72 h,  $CV = 4.2\%$ ) or with fluorescent dye (from 4 to 6 h,  $CV = 2.05\%$ ).

**CONCLUSIONS.** The *in vitro* method assessing specific potency of filgrastim-based preparations using NFS-60 cell line is linear, precise, and accurate, and has proven to be stable under controlled changes of certain parameters. Confirmed applicability of NFS-60 cell line for assessing the potency of filgrastim-based preparations is essential for manufacturers, since it expands the range of cell cultures used for quality assessment of preparations.

**Keywords:** specific activity; biological method; validation parameters; correctness; linearity; robustness; precision; NFS-60 cell line; granulocyte colony-stimulating factor

**For citation:** Gaiderova L.A., Baykova M.L., Golovinskaya O.V., Lysikova S.L., Fomenko V.V., Alpatova N.A. Validation of an *in vitro* biological method for filgrastim potency assessment. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(1):85–96. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96>

**Funding.** The study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00061-26-00 (R&D Registry No. 124022200103-5).  
**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в мировой фармацевтической практике сохраняется интерес к производству биотехнологических лекарственных препаратов (ЛП) на основе гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) – биоаналогичных (биоподобных) филграстимов и препаратов, которые благодаря измененной структуре молекулы обладают увеличенным периодом полувыведения, сниженной частотой нежелательных и побочных эффектов. Филграстим, рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (рчГ-КСФ), представляет собой негликозилированный белок, полученный с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Продуцентами рчГ-КСФ являются штаммы *Escherichia coli*, в геном которых введен ген человеческого Г-КСФ [1]. Филграстим проявляет биологическую активность при взаимодействии с рецепторами к Г-КСФ, которые экспрессированы на поверхности клеток миелоидного ряда. Принцип действия Г-КСФ заключается в стимуляции пролиферации клеток-предшественников и дифференцировки их в зрелые нейтрофилы, что широко используется при лечении нейтропении, вызванной химиотерапией, у пациентов с онкологическими заболеваниями [2, 3].

Специфическая активность – критичный показатель качества биотехнологических ЛП, который должен объективно и надежно оцениваться на всех этапах жизненного цикла ЛП [4]. Целесообразно оценивать относительную специфическую активность (RP), сравнивая эффект ЛП с эффектом соответствующего стандартного образца<sup>1</sup>. Активность ЛП, действующим веществом которых является филграстим, оценивают биологическим методом *in vitro* по уровню пролиферации клеточных линий, чувствительных к действию филграстима.

Биологические тест-системы (БТС) играют важную роль в современных биомедицинских исследованиях и разработках биологических ЛП и позволяют изучать процессы, определяющие патогенез заболевания. БТС позволяют воспроизводить механизм действия ЛП на молекулярном уровне и выбирать пригодные методики оценки специфической биологической активности ЛП для подтверждения стабильности и постоянства качества ЛП по данному показателю на протяжении всего жизненного цикла ЛП. Кроме того, БТС необходимы при доказательстве биоподобия биоаналогичного ЛП референтному

препарату [5–7]. Известно, что результаты, полученные с использованием БТС, характеризуются высокой вариабельностью, достигающей 50%. Есть несколько причин вариабельности результатов испытаний на клеточных линиях: разная чувствительность клеток; уровень жизнеспособности и концентрации клеток; количество пассажей; периодичность и условия пересевов при рутинном культивировании; продолжительность культивирования до момента использования в испытании; состав питательной среды; время инкубации клеток с препаратом; параметры инкубирования и др. [8–10]. Таким образом, стандартизации биологических методик, применяемых при оценке специфической активности ЛП, следует уделять особое внимание.

Учитывая значимое влияние перечисленных выше факторов на надежность и релевантность результатов, получаемых при постановке биологической методики *in vitro*, такие факторы должны быть изучены при валидации методики в процессе ее разработки. Подтверждение правильности и прецизионности методики способствует получению валидных результатов<sup>2</sup>. В течение жизненного цикла ЛП возможно внесение изменений, в том числе критичных, в методику оценки специфической активности, что предусматривает проведение исследований по подтверждению валидационных характеристик.

При контроле качества ЛП на основе филграстима специфическая активность оценивается по стимулирующему действию на пролиферацию чувствительных к Г-КСФ клеток, уровень которой определяется с помощью различных красителей и реагентов [10–14]. В монографии Европейской фармакопеи The Filgrastim concentrated solution предложено применение клеточной линии M-NFS-60 (ATCC, No. CRL-1839)<sup>3</sup> для оценки специфической активности филграстима. Однако активность ряда ЛП на основе филграстима оценивается с применением клеточной линии NFS-60. Обе клеточные линии получены от мышей с миелоидным лейкозом и являются чувствительными к Г-КСФ. При этом M-NFS-60 представляет собой клеточную сублинию, полученную из NFS-60 при культивировании в присутствии макрофагального КСФ [15]. Кроме того, клеточную линию M-NFS-60 использовали в международных исследованиях по разработке 2-го Международного стандартного образца Г-КСФ [16]. Учитывая, что при оценке качества филграстима производители применяют клеточные линии M-NFS-60

<sup>1</sup> 1032 Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

<sup>2</sup> ICH Q2(R) Validation of analytical procedures. EMA; 2023.

ICH Q14 Analytical procedure development. EMA; 2023.

<sup>3</sup> 2206 Filgrastim concentrated solution. European Pharmacopoeia 11.5. Strasbourg: EDQM; 2024.

и NFS-60, одна из которых предусмотрена монографией Европейской фармакопеи, целесообразно подтвердить валидационные характеристики методики с использованием NFS-60 с целью включения соответствующей общей фармакопейной статьи в Государственную фармакопею Российской Федерации.

Цель работы – выбор параметров и подтверждение ряда валидационных характеристик методики оценки специфической активности филграстима биологическим методом *in vitro* при использовании клеточной линии NFS-60.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: подобрать оптимальные условия для проведения испытания и уточнить ряд параметров методики (дозы филграстима, концентрация клеток в лунке, время инкубации с красителем); изучить валидационные характеристики методики, такие как правильность, линейность, прецизионность и устойчивость (робастность).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

В работе использовали следующие материалы и реагенты: клеточная линия NFS-60 (CLS, Германия, кат. № 400301) – цитокинзависимые мышинные миелобласты, полученные после заражения взрослых мышей вирусом Cas-Bv-MuLV; 2-й Международный стандартный образец (МСО) рГ-КСФ (2nd International standard for granulocyte colony stimulating factor, human rDNA-derived, NIBSC, code 09/136, 95000 МЕ/ампула, 100 МЕ  $\approx$  1 нг белка); питательная среда RPMI-1640 («ПанЭко», Россия, кат. № с330п); фетальная бычья сыворотка, термически инактивированная (HyClone, США, кат. № SH30070.03); 50 мг/мл гентамицин («ПанЭко», Россия, кат. № A011); 200 мМ GlutaMAX (Gibco, США, кат. № 35050061); 1 М HEPES (Gibco, США, кат. № 15630-080); ростовой фактор интерлейкин-3 (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № 14144); флуоресцентный краситель alamarBlue™ (Invitrogen, США, кат. № DAL1100); 0,4% трипановый синий (Sigma-Aldrich, Германия, кат. № T8154); фосфатно-солевой буфер Дульбекко (Gibco, США, кат. № 141190-144). В работе также использовали 96-луночные полистироловые планшеты (Corning, США, кат. № 3599).

### Методы

**Культивирование клеток** линии NFS-60 осуществляли в стандартных условиях при 37°C, 5 $\pm$ 2% CO<sub>2</sub> и увлажненной атмосфере в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Binder C-150 (BINDER, Германия) в среде

RPMI-1640, обогащенной интерлейкином-3 (2 нг/мл), 10% фетальной бычьей сывороткой, 2 мМ GlutaMAX, 25 мМ HEPES и содержащей 50 мкг/мл гентамицина для предотвращения бактериальной контаминации. Клеточную суспензию пассировали каждые 48–72 ч; плотность при переосеве составила от 2,5 $\times$ 10<sup>4</sup> до 5 $\times$ 10<sup>4</sup> клеток/мл.

Перед началом испытания клетки трижды отмывали от интерлейкина-3 путем центрифугирования при 250 g в фосфатно-солевом буфере Дульбекко. После третьего цикла центрифугирования осадок ресуспендировали в среде для анализа (идентична по составу среде для культивирования, но не содержит интерлейкин-3), затем отбирали аликвоту суспензии, окрашивали 0,4% раствором трипанового синего и подсчитывали количество жизнеспособных клеток. В испытании использовали культуру клеток с жизнеспособностью не менее 90% и плотностью 1,5 $\times$ 10<sup>5</sup> клеток/мл; при изучении устойчивости методики – 3,0 $\times$ 10<sup>5</sup> клеток/мл. Непосредственно перед началом испытания к клеточной суспензии добавляли 2-меркаптоэтанол до конечной концентрации 0,1 мМ.

**Изучение валидационных характеристик методики.** В качестве стандартного образца (СО) и испытуемого образца (ИО) использовали независимые разведения одной и той же серии МСО рГ-КСФ. Для одного независимого определения готовили две независимые серии разведений МСО от 208 МЕ/мл ( $\approx$  2 нг/мл) до 0,1 МЕ/мл ( $\approx$  0,001 нг/мл). Каждую серию разведений вносили в лунки культурального планшета в трех повторностях (100 мкл/лунка) и добавляли равный объем ранее подготовленной клеточной суспензии. Значения активности образцов в лунках после внесения суспензии составили 104, 52, 26, 13, 6,5, 3,25, 1,63, 0,81, 0,41, 0,20, 0,10 и 0,05 МЕ/мл, а концентрация клеток – 0,75 $\times$ 10<sup>5</sup> клеток/мл; при изучении устойчивости методики использовали 1,5 $\times$ 10<sup>5</sup> клеток/мл.

Планшеты, содержащие реакцию смеси, инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 48 ч (при изучении устойчивости методики – в течение 72 ч) при 37°C и 5 $\pm$ 2% CO<sub>2</sub> и увлажненной атмосфере. Далее в лунки с СО и ИО добавляли по 20 мкл alamarBlue™ и инкубировали в течение 4 ч (при изучении устойчивости методики – в течение 6 ч) в тех же условиях. По окончании инкубации регистрировали сигналы флуоресценции при длинах волн 530 и 620 нм возбуждения и эмиссии соответственно.

При изучении **линейности** методики готовили модельные растворы МСО с ожидаемой активностью 80, 90, 100, 110 и 120% относительно МСО, выбранного в качестве СО с активностью

100%. Остальная процедура испытания оставалась без изменений.

Оценка **пригодности** системы и ИО является неотъемлемой частью аналитических методик и основана на концепции, что оборудование, реагенты, процедуры и ИО составляют целостную систему<sup>4</sup>. Для обеспечения надежности анализа и достоверности результатов устанавливают требования к критериям пригодности системы (для СО), тогда как для ИО также оценивают степень его подобия СО в качестве критериев приемлемости результатов испытания<sup>5</sup> [4].

**Статистический анализ данных.** Полученные в испытаниях данные анализировали в программе PLA 2.0.0 (Stegmann Systems, Германия) методом параллельных линий с использованием 4-параметрической логистической функции 4PL. Проводили аппроксимацию зависимости значений сигналов флуоресценции от десятичного логарифма концентрации филграстима. Значения средних величин, стандартных отклонений и коэффициентов вариации (CV) рассчитывали в программе Microsoft Excel. Значения коэффициентов детерминации ( $R^2$ ) кривых зависимости «доза–эффект» для СО и ИО рассчитывали автоматически для определения степени зависимости между регрессионной моделью и исходными данными. Средние значения указанных параметров рассчитывали для всех независимых определений в рамках испытания с одинаковым набором условий.

**Критерии пригодности и приемлемости.** Полученные результаты оценивали на соответствие критериям пригодности системы и приемлемости результатов, чтобы подтвердить надежность данных<sup>6</sup> [17]. Использовали следующие критерии:  $R^2 \geq 0,95$ ; динамический диапазон анализа, для оценки которого определяли отношение максимального значения сигнала к минимальному значению (соотношение асимптот  $\geq 3$ ); наличие линейного участка на дозозависимой кривой, содержащего не менее 3 точек; CV для 3 повторностей каждого разведения образцов<sup>7</sup>.

При оценке критериев пригодности системы использовали следующие параметры<sup>8</sup>: кривая

зависимости интенсивности сигнала от концентрации СО включает не менее 3 точек в линейном диапазоне; значение  $R^2$  кривой зависимости от дозы СО должно быть  $\geq 0,95$ ; значения CV единиц флуоресценции для повторностей каждого разведения СО должны быть  $\leq 25\%$ .

Были установлены следующие критерии приемлемости результатов испытания для ИО (разведения МСО, взятого в качестве ИО)<sup>9</sup>: статистический анализ данных подтверждает отсутствие отклонений от линейности и параллельности кривой зависимости от дозы ИО по сравнению с СО ( $P=0,95$ ); значение  $R^2$  кривой зависимости от дозы ИО должно быть  $\geq 0,95$ ; значения CV единиц флуоресценции для повторностей каждого разведения ИО должны быть  $\leq 25\%$ .

При соблюдении критериев пригодности системы и приемлемости результатов рассчитывали значения относительной специфической активности (RP) по формуле (1).

$$RP = \frac{EC_{50} \text{ MCO\_CO}}{EC_{50} \text{ MCO\_IO}} \times 100\%, \quad (1)$$

где  $EC_{50} \text{ MCO\_CO}$  – полумаксимальная эффективная концентрация международного стандартного образца, взятого в качестве стандартного образца, нг/мл;  $EC_{50} \text{ MCO\_IO}$  – полумаксимальная эффективная концентрация международного стандартного образца, взятого в качестве испытуемого образца, нг/мл.

**Валидационные испытания.** В соответствии с ОФС.1.1.0012 и Решением Коллегии ЕЭК № 113 методики оценки специфической активности биотехнологических лекарственных препаратов относятся к количественным и для обеспечения достоверности результатов испытания должны обладать правильностью, линейностью, воспроизводимостью, прецизионностью, специфичностью и устойчивостью<sup>10</sup>.

**Прецизионность** методики для оценки изменчивости повторяющихся измерений изучали на двух уровнях: повторяемость и внутрилабораторная прецизионность. Испытания по оценке прецизионности проводили в разные дни с участием одного или двух аналитиков.

<sup>4</sup> 1032 Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

<sup>5</sup> 1032 Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

<sup>6</sup> 1034 Analysis of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

<sup>7</sup> <https://www.pharmtech.com/view/establishing-systems-suitability-and-validity-criteria-for-analytical-methods-and-bioassays>

<sup>8</sup> 1032 Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

<sup>9</sup> 1034 Analysis of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

<sup>10</sup> ICH Q14 Analytical procedure development. EMA; 2023.

<sup>9</sup> Там же.

<sup>10</sup> ОФС.1.1.0012. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023. Решение Коллегии ЕЭК от 17.07.2018 № 113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств».

Для подтверждения повторяемости одним аналитиком выполнено 9 независимых определений. Повторяемость оценивали по величине CV значений RP, полученных в независимых определениях. Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам, полученным двумя аналитиками в 6 независимых определениях в разные дни. Рассчитывали величину CV средних значений RP, полученных разными аналитиками<sup>11</sup>.

**Правильность** методики подтверждали путем выполнения 9 независимых определений. Для каждого независимого определения методом параллельных линий рассчитывали RP. Степень извлечения (%) рассчитывали по формуле (2).

$$\text{Степень извлечения} = \frac{\text{RP (получено)}}{\text{RP (ожидаемо)}} \times 100\%, \quad (2)$$

где RP (получено) – значение относительной специфической активности, полученное в испытании; RP (ожидаемо) – значение относительной специфической активности, рассчитанное при приготовлении модельных образцов.

В качестве критерия приемлемости результатов использовали критерий степень извлечения  $\pm 25\%$  от ожидаемого значения<sup>12</sup>.

**Линейность** разведения образцов, то есть наличие линейной зависимости между значениями ожидаемой и полученной RP, изучали на модельных образцах с ожидаемой активностью 80, 90, 100, 110 и 120% в пределах аналитической области методики (80–125%). Проводили 3 независимых испытания по определению RP для каждого модельного образца. Если значение  $R^2$  из графика зависимости между ожидаемыми и полученными значениями активности в соответствии с установленными критериями составляло  $\geq 0,95$ , методику признавали линейной в заданном диапазоне<sup>13</sup>.

При изучении **робастности** методики оценивали влияние на RP контролируемых изменений параметров при проведении испытаний: плотность клеточной суспензии –  $1,5 \times 10^5$  и  $3,0 \times 10^5$  клеток/мл; продолжительность инкубации клеток с образцами – 48 или 72 ч; продолжительность инкубации после внесения

красителя alamarBlue™ – 4 или 6 ч. Отдельное испытание каждого из исследуемых параметров включало  $\geq 6$  независимых определений. В качестве критерия приемлемости использовали  $CV \leq 25\%$  значений RP, полученных в независимых определениях<sup>14</sup>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Любое изменение, вносимое в валидированную методику анализа биологической активности, должно оцениваться с точки зрения его влияния на валидационные характеристики и соответствие методики заявленному назначению. Изменения можно считать незначительными, если не затрагивается биологическая основа анализа. В таком случае допустимо проведение верификационных исследований для подтверждения отсутствия негативного влияния изменений на валидность методики [18]. Внесение значимых изменений требует проведения валидации методики в полном объеме. Поскольку клеточные линии M-NFS-60 и NFS-60 имеют общее происхождение, аналогичные характеристики и чувствительны к Г-КСФ, в данном исследовании только часть валидационных характеристик методики оценки специфической активности филграстима изучали на клеточной линии NFS-60.

На предварительном этапе были подобраны оптимальные условия проведения испытаний, такие как концентрации образцов филграстима и диапазон их разведений, количество клеток на лунку, время инкубации и краситель для идентификации пролиферирующих клеток. Оптимальные условия воспроизведения методики оценки специфической активности филграстима с использованием клеток линии NFS-60 [14] приведены в *таблице 1*.

**Зависимость пролиферации клеток линии NFS-60 от дозы филграстима.** Наличие прямой зависимости уровня пролиферации клеток линии NFS-60 от используемых доз филграстима подтверждено экспериментально. На *рисунке S1* (опубликован на сайте журнала<sup>15</sup>) показано, что кривая зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма доз филграстима (кривая зависимости «доза–эффект») при использовании клеточной линии NFS-60 характеризуется

<sup>11</sup> ICH Q2(R) Validation of analytical procedures. EMA; 2023.

1033 Biological assay validation. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

<sup>12</sup> 1033 Biological assay validation. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

<sup>13</sup> 1033 Biological assay validation. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

ICH Q2(R) Validation of analytical procedures. EMA; 2023.

<sup>14</sup> 1033 Biological assay validation. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

1034 Analysis of biological assays. United States Pharmacopeia. USP–NF. Rockville; 2024.

ICH Q2(R) Validation of analytical procedures. EMA; 2023.

<sup>15</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s1>

**Таблица 1.** Оптимальные условия воспроизведения методики оценки специфической активности филграстима с использованием клеточной линии NFS-60

**Table 1.** The optimal conditions for repeating assessment method of filgrastim potency using NFS-60 cell line

Параметры / <i>Parameters</i>	Значения параметров / <i>Values</i>
Активность образца в первой лунке, МЕ/мл <i>Sample potency in the first well, IU/mL</i>	208
Концентрация образца в первой лунке, нг/мл <i>Sample concentration in the first well, ng/mL</i>	2
Кратность разведений / <i>Dilution factor</i>	1:1
Вносимый объем образцов и суспензии клеток, мкл <i>Volume of samples and cell suspension introduced, <math>\mu</math>L</i>	100
Время инкубации, ч / <i>Incubation time, h</i>	48
Краситель / <i>Dye</i>	AlamarBlue™
Метод детектирования / <i>Detection method</i> Длины волн, нм / <i>Wavelengths, nm</i>	Флуориметрия / <i>Fluorimetry</i> 530 и 620 / <i>530 and 620</i>

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

приемлемыми результатами в диапазоне концентраций от 0,0005 до 0,52 нг/мл или активностей от 0,05 до 52 МЕ/мл.

На графике кривой зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма доз образца филграстима определен линейный участок, соответствующий условию  $R^2 \geq 0,95$  (табл. S1, опубликована на сайте журнала<sup>16</sup>). Пример линейного участка кривой зависимости «доза–эффект» представлен на рисунке S2 (опубликован на сайте журнала<sup>17</sup>). Кривая имеет выраженное верхнее и нижнее плато – 52 и 0,05 МЕ/мл соответственно, линейный участок в диапазоне концентраций от 0,008 до 0,0325 нг/мл или активностей от 0,8–3,25 МЕ/мл и  $R^2=0,99$  (рис. S1 и S2, опубликованы на сайте журнала). Поскольку кривая имеет верхнее и нижнее плато с отношением асимптот  $>4$ , не менее 3 точек на линейном участке кривой и  $R^2=0,99$ , то критерии приемлемости были соблюдены.

**Повторяемость** методики оценивали по близости результатов, полученных в независимых определениях, проводимых одним аналитиком в одинаковых условиях на одном оборудовании в пределах короткого промежутка времени. Методику считали соответствующей данной характеристике, если значение CV между значениями RP составляло  $\leq 25\%$  (табл. 2). CV значений RP между независимыми определениями не превышал 9,2%, а между испытаниями составил 6,2%.

**Внутрилабораторную прецизионность** оценивали по результатам, полученным разными аналитиками на разном оборудовании в разные дни.

В качестве критерия приемлемости использовали  $CV \leq 25\%$ . Средние значения RP и CV представлены в таблице 3.

Данные таблицы 3 демонстрируют воспроизводимость результатов биологической методики, полученных двумя аналитиками. Значения  $RP \pm$  стандартное отклонение составили  $101,6 \pm 0,97$  и  $99,9 \pm 0,98\%$  для аналитика № 1 и 2 соответственно, а значение  $CV=1,19\%$ . Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной прецизионности методики.

**Правильность** методики изучали по критерию «Степень извлечения». Для каждого независимого определения рассчитывали значения RP. В качестве критерия приемлемости результатов рассматривали степень извлечения  $\pm 25\%$  от ожидаемого значения. Значение степени извлечения для образца (табл. 4) составило 101,6% и не превышало отклонения  $\pm 10\%$  от ожидаемого значения. Таким образом, полученные данные позволили сделать вывод, что правильность методики подтверждена.

Для подтверждения **линейности** методики в пределах аналитического диапазона строили графики линейной регрессии, аппроксимируя значения полученной активности от ожидаемой, при использовании испытуемого образца с симулированной активностью от 80% до 120%. В качестве критерия приемлемости линейности методики рассматривали значение  $R^2 \geq 0,95$  между измеренными и ожидаемыми значениями RP. Средние значения полученных RP для каждого из 3 определений представлены в таблице 5. На рисунке S3 (опубликован на сайте журнала<sup>18</sup>)

<sup>16</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-table-s1>

<sup>17</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s2>

<sup>18</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s3>

**Таблица 2.** Результаты испытаний валидационной характеристики «Повторяемость» методики оценки специфической активности филграстима

**Table 2.** Repeatability of the method for assessing filgrastim potency (test results of a validation parameter)

Независимое определение <i>Independent determination</i>	Относительная специфическая активность, % <i>Relative potency, %</i>	Среднее значение <i>Mean value</i>	CV, %	95% ДИ <i>95% CI</i>
1	99,3	101,6	6,2	96,77–106,39
2	100,7			
3	101,1			
1	106,8			
2	91,7			
3	109,0			
1	92,8			
2	107,8			
3	105,0			

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

Примечание. ДИ – доверительный интервал; CV – коэффициент вариации.

Note. CI, confidence interval; CV, coefficient of variation.

**Таблица 3.** Результаты испытаний валидационной характеристики «Внутрилабораторная прецизионность» методики оценки специфической активности филграстима

**Table 3.** Intermediate precision of the method for assessing filgrastim potency (test results of a validation parameter)

№ определения <i>Test No.</i>	Значения RP (%), полученные разными аналитиками в разные дни <i>RP values (%) obtained by different analysts on different days</i>	
	Аналитик № 1 / <i>Analyst No. 1</i>	Аналитик № 2 / <i>Analyst No. 2</i>
1	101,5	99,9
2	101,7	98,9
3	101,2	98,9
4	101,7	100,4
5	103,2	99,7
6	100,2	101,5
Среднее значение RP, % <i>Mean value of RP, %</i>	101,6	99,9
95% ДИ / <i>95% CI</i>	99,66–103,54	97,93–101,87
CV, %	1,19	

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

Примечание. RP – относительная специфическая активность; ДИ – доверительный интервал; CV – коэффициент вариации.

Note. RP, relative potency; CI, confidence interval; CV, coefficient of variation.

приведен график зависимости полученных значений RP от соответствующих значений ожидаемой активности (теоретические значения RP).

Продemonстрирована линейная зависимость между полученными и ожидаемыми значениями RP. Показано, что теоретические значения RP (80, 90, 100, 110 и 120%) прямо пропорциональны экспериментально установленным значениям RP. Значение  $R^2=0,99$  соответствует критерию приемлемости  $R^2 \geq 0,95$ . Таким образом, методика может дифференцировать уровни

относительной специфической активности ИО от 80 до 120% относительно СО (табл. 5).

Значение оценки **устойчивости** (робастности) методики заключается в установлении параметров пригодности системы для поддержания ее валидности. Отдельное испытание для каждого из исследуемых параметров методики оценки RP филграстима (плотность клеточной суспензии, продолжительность инкубации образцов с клеточной суспензией и с красителем) включало минимум 6 независимых определений.

На первом этапе оценивали, насколько методика устойчива к изменению плотности клеточной суспензии. В испытаниях использовали клеточные суспензии, содержащие  $1,5 \times 10^5$  или  $3,0 \times 10^5$  клеток/мл. Полученные результаты приведены в *таблице 6*, из которой следует, что увеличение плотности клеточной суспензии с  $1,5 \times 10^5$  до  $3,0 \times 10^5$  клеток/мл не оказывало влияния на результат определения RP.

На втором этапе определяли чувствительность методики к увеличению продолжительности инкубации образцов филграстима с клеточной суспензией с 48 до 72 ч. Полученные значения RP, представленные в *таблице 6*, указывают на отсутствие зависимости значений активности образцов от увеличения времени инкубации с клеточной суспензией.

На третьем этапе оценивали, насколько методика устойчива к изменению продолжительности инкубации с красителем. После добавления в анализируемые лунки красителя alamarBlue™ планшеты оставляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 4 или 6 ч. Из *таблицы 6* видно, что активность образцов не зависит от увеличения продолжительности инкубации с красителем.

Таким образом, испытуемая методика устойчива к незначительным контролируемым изменениям, а именно увеличению плотности клеточной суспензии и продолжительности инкубации образцов с клеточной суспензией или красителем alamarBlue™.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных показал, что все проведенные испытания с использованием в качестве СО и ИО независимых разведений 2-го МСО Г-КСФ и клеточной линии NFS-60 соответствуют критериям пригодности системы, критериям приемлемости образца и являются

**Таблица 4.** Результаты испытаний валидационной характеристики «Правильность» методики оценки специфической активности филграстима

**Table 4.** Accuracy of the method for assessing filgrastim potency (test results of a validation parameter)

№ определения <i>Test No.</i>	RP, %
1	99,3
2	100,7
3	101,1
4	106,8
5	91,7
6	109,0
7	92,8
8	107,8
9	105,0
Среднее значение RP, % <i>Mean RP, %</i>	101,6
Ожидаемое значение RP, % <i>Expected RP, %</i>	100,0
Степень извлечения, % <i>Degree of recovery, %</i>	101,6

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

*Примечание.* RP – относительная специфическая активность.

*Note.* RP, relative potency.

валидными. Подтверждена пригодность системы. В качестве критериев рассматривали наличие линейности ответа при  $R^2 \geq 0,95$ , не менее 3 точек на линейном участке кривой, отношение асимптот  $\geq 3$  (отношение максимального значения сигнала к минимальному),  $CV \leq 25\%$  между повторностями каждого разведения. Подтверждено отсутствие отклонений

**Таблица 5.** Результаты испытаний валидационной характеристики «Линейность» методики оценки специфической активности филграстима

**Table 5.** Linearity of the method for assessing filgrastim potency (test results of a validation parameter)

Ожидаемое значение RP, % <i>Expected RP, %</i>	Количество испытаний <i>Number of tests</i>	Среднее значение RP (полученное), % <i>Mean RP (obtained), %</i>	Степень извлечения, % <i>Degree of recovery, %</i>	Степень извлечения, 95% ДИ <i>Degree of recovery, 95% CI</i>	CV, %
80	3	79,59	99,49	97,77–101,21	3,8
90	3	90,61	100,68	98,80–102,56	3,8
100	3	101,04	101,04	99,54–102,54	2,7
110	3	110,08	100,07	98,24–101,90	3,0
120	3	119,76	99,80	97,64–101,96	3,2

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

*Примечание.* RP – относительная специфическая активность; ДИ – доверительный интервал; CV – коэффициент вариации.

*Note.* RP, relative potency; CI, confidence interval; CV, coefficient of variation.

**Таблица 6.** Результаты испытаний для валидационной характеристики «Робастность» методики оценки специфической активности филграстима

**Table 6.** Robustness of assessment method for filgrastim potency (test results of a validation parameter)

№ определения <i>Test No.</i>	Значения относительной специфической активности, % / <i>Relative potency, %</i>					
	Плотность клеточной суспензии, клеток/мл <i>Cell suspension density, cells/mL</i>		Продолжительность инкубации образцов с клеточной суспензией, ч <i>Incubation time of samples with cell suspension, h</i>		Продолжительность инкубации с alamarBlue™, ч <i>Incubation time with alamarBlue™, h</i>	
	1,5×10 <sup>5</sup>	3,0×10 <sup>5</sup>	48	72	4	6
1	101,5	102,1	101,5	95,5	101,5	98,6
2	101,7	101,0	101,7	97,5	101,7	98,3
3	101,2	103,0	101,2	94,1	101,2	97,2
4	101,7	101,9	101,7	94,7	101,7	99,1
5	103,2	101,3	103,2	95,8	103,2	98,3
6	100,2	99,8	100,2	97,2	100,2	100,8
Среднее значение RP, % <i>Mean value of RP, %</i>	101,6	101,5	101,6	95,8	101,6	98,7
CV, %	0,07		4,20		2,05	

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

*Примечание.* RP – относительная специфическая активность; CV – коэффициент вариации.

*Note.* RP, relative potency; CV, coefficient of variation.

**Таблица 7.** Валидационные характеристики методики оценки специфической активности филграстима с использованием клеточной линии NFS-60

**Table 7.** Validation parameters of the method for assessing filgrastim potency using NFS-60 cell line

Характеристика <i>Parameter</i>	Критерий <i>Criterion</i>	Результат <i>Result</i>	Заключение <i>Conclusion</i>
Правильность / <i>Accuracy</i>	Степень извлечения ±25% <i>Degree of recovery ±25%</i>	+1,6%	Методика охарактеризована как правильная / <i>The method is characterized as accurate</i>
Линейность / <i>Linearity</i>	R <sup>2</sup> ≥0,95	R <sup>2</sup> =0,99	Методика охарактеризована как линейная <i>The method is characterized as linear</i>
Робастность / <i>Robustness</i>			
Плотность клеточной суспензии <i>Density of cell suspension</i>	CV≤25%	0,07%	Методика устойчива к увеличению плотности клеточной суспензии / <i>The method is robust to increasing cell suspension density</i>
Продолжительность инкубации образцов с клеточной суспензией <i>Incubation time of samples with cell suspension</i>	CV≤25%	4,2%	Методика устойчива к увеличению продолжительности инкубации образцов с клеточной суспензией / <i>The method is robust to increasing incubation time of samples with cell suspension</i>
Продолжительность инкубации с красителем <i>Incubation time of samples with a dye</i>	CV≤25%	2,05%	Методика устойчива к увеличению продолжительности инкубации с красителем <i>The method is robust to increasing incubation time after the addition of a dye</i>
Прецизионность / <i>Precision</i>			
Повторяемость / <i>Repeatability</i>	CV≤25%	6,20%	Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность методики подтверждены <i>Repeatability and intermediate precision of the method are confirmed</i>
Внутрилабораторная прецизионность <i>Intermediate precision</i>	CV≤25%	1,19%	

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

*Примечание.* RP – относительная специфическая активность; CV – коэффициент вариации; R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации.

*Note.* RP, relative potency; CV, coefficient of variation; R<sup>2</sup>, coefficient of determination.

от линейности и параллельности кривой зависимости специфической активности от дозы филграстима для ИО по сравнению с СО.

Валидационные характеристики методики оценки специфической активности филграстима биологическим методом на клеточной линии NFS-60 представлены в *таблице 7*. Сопоставление полученных данных позволяет сделать вывод, что валидационные характеристики методики правильность, линейность, прецизионность и устойчивость (робастность) соответствуют установленным критериям.

Оценка специфической активности – одного из критичных показателей качества ЛП с применением валидированной методики – является ключевым аспектом обеспечения безопасности и эффективности ЛП. Стабильная воспроизводимость методики позволяет минимизировать необходимость в повторных испытаниях, что способствует сокращению сроков проведения экспертизы качества лекарственных средств и повышению экономической эффективности исследовательских процессов. Приведенная в статье методика оценки активности МСО рГ-КСФ может применяться

как для рутинного контроля специфической активности ЛП, так и для подтверждения биоподобия новых разрабатываемых препаратов на основе филграстима.

## ВЫВОДЫ

1. Методика оценки специфической биологической активности препаратов на основе филграстима является валидной при использовании клеточной линии NFS-60 в воспроизведенных условиях.
2. Подобраны оптимальные условия и параметры (дозы филграстима, концентрация клеток, время инкубации с красителем) методики оценки специфической активности филграстима биологическим методом *in vitro* при использовании клеточной линии NFS-60.
3. Подтверждены валидационные характеристики методики, такие как правильность, линейность, прецизионность и робастность.
4. Данные, полученные при подтверждении валидационных характеристик методики, соответствуют критериям пригодности системы и приемлемости результатов испытаний.

## Литература/References

1. Trinh NTM, Thuoc TL, Thao DTP. Production of recombinant human G-CSF from non-classical inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol*. 2021;52(2):541–6. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00413-y>
2. Bond TC, Szabo E, Gabriel S, et al. Meta-analysis and indirect treatment comparison of lipegfilgrastim with pegfilgrastim and filgrastim for the reduction of chemotherapy-induced neutropenia-related events. *J Oncol Pharm Pract*. 2018;24(6):412–23. <https://doi.org/10.1177/1078155217714859>
3. Cornes P, Gascon P, Chan St, et al. Systematic review and meta-analysis of short-versus long-acting granulocyte colony-stimulating factors for reduction of chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Adv Ther*. 2018;35(11):1816–29. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0798-6>
4. Levy MJ, Gucinski AC, Sommers CD, et al. Analytical techniques and bioactivity assays to compare the structure and function of filgrastim (granulocyte-colony stimulating factor) therapeutics from different manufacturers. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(26):6559–67. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7469-x>
5. Magalhaes V, Mantovani M, Caruso C, et al. Physicochemical and biological comparison of the first Brazilian biosimilar filgrastim with its reference product. *Biosimilars*. 2016;6:45–60. <https://doi.org/10.2147/BS.S107898>
6. Caselli D, Cesaro S, Aricò M. Biosimilars in the management of neutropenia: Focus on filgrastim. *Biologics*. 2016;10:17–22. <https://doi.org/10.2147/BTT.S73580>
7. Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Алпатова НА и др. Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора. Оценка качества. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(1):4–14. Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Alpatova NA, et al. Recombinant granulocyte colony stimulating factor biosimilars. Quality assessment. *BIOpreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(1):4–14 (In Russ.). EDN: [UBEKFI](https://doi.org/10.1007/s42770-020-00413-y)
8. White JR, Abodeely M, Ahmed S, et al. Best practices in bioassay development to support registration of biopharmaceuticals. *Biotechniques*. 2019;67(3):126–37. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0031>
9. Li H, Witkos TM, Umlauf S, Thompson C. Potency assay variability estimation in practice. *Pharm Stat*. 2025;24(1):e2408. <https://doi.org/10.1002/pst.2408>
10. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017;1601:1–17. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1)
11. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):10. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
12. Tiwari K, Wavdhane M, Haque S, et al. A sensitive WST-8-based bioassay for PEGylated granulocyte colony stimulating factor using the NFS-60 cell line. *Pharm Biol*. 2015;53(6):849–54. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.943248>
13. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the alamarBlue assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):10. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095489>
14. Головинская ОВ, Байкова МЛ, Алпатова НА и др. Сравнительный анализ красителей, используемых при оценке специфической активности лекарственных средств на основе филграстима биологическим методом *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(3):193–201. Golovinskaya OV, Baykova ML, Alpatova NA, et al. Comparative analysis of dyes used in the assessment of filgrastim products specific activity by biological *in vitro* methods. *BIOpreparations. Prevention,*

- Diagnosis, Treatment*. 2020;20(3):193–201 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-3-193-201>
15. Nakoinz I, Lee MT, Weaver JF, Ralph P. Differentiation of the IL-3-dependent NFS-60 cell line and adaption to growth in macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*. 1990;145(3):860–4. PMID: [2142710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2142710/)
  16. Wadhwa M, Bird C, Hamill M, et al. The 2nd International Standard for human granulocyte colony stimulating factor. *J Immunol Methods*. 2011;367(1–2):63–9. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.02.005>
  17. Никонова ЮА, Аббасова СГ, Каргополова ПЕ и др. Валидация методики оценки биологической активности лекарственного препарата на основе тоцилизумаба и определение критериев приемлемости результатов анализа. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):317–29. Nikonova YuA, Abbasova SG, Kargopolova PE, et al. Validation of an analytical procedure for evaluating the biological activity of a medicinal product based on tocilizumab and determination of acceptance criteria for test results. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):317–29 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329>
  18. Kirkland PD, Newberry KM. Your assay has changed – is it still “fit for purpose”? What evaluation is required. *Rev Sci Tech*. 2021;40(1):205–15. <https://doi.org/10.20506/rst.40.1.3218>

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены *таблица S1 и рисунки S1–S3*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-table-s1>  
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s1>  
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s2>  
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s3>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Л.А. Гайдерова** – утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **М.Л. Байкова** – проведение испытаний, сбор и систематизация данных; **О.В. Головинская** – анализ и интерпретация результатов, редактирование текста рукописи; **С.Л. Лысикова** – систематизация литературных данных; **В.В. Фоменко** – проведение испытаний, написание текста рукописи; **Н.А. Алпатова** – дизайн исследования, систематизация литературных данных, формулировка выводов.

**Additional information.** *Table S1 and Figures S1–S3* are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-table-s1>  
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s1>  
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s2>  
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-85-96-fig-s3>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **L.A. Gaiderova** approved the final version of the manuscript. **M.L. Baykova** conducted the study, collected and systematized the data. **O.V. Golovinskaya** analyzed and interpreted the results, and revised the manuscript. **S.L. Lysikova** systematized literature data. **V.V. Fomenko** conducted the study and drafted the manuscript. **N.A. Alpatova** designed the study, systematized literature data, and formulated the conclusions.

## Об авторах / Authors

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук / Lidia A. Gaiderova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Байкова Марина Леонидовна / Marina L. Baykova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9889-4038>

Головинская Ольга Вячеславовна, канд. мед. наук / Olga V. Golovinskaya, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

Лысикова Светлана Леонидовна, канд. мед. наук / Svetlana L. Lysikova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7864-8972>

Фоменко Виктория Валерьевна / Viktoriia V. Fomenko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8677-0927>

Алпатова Наталья Александровна, д-р биол. наук / Natalia A. Alpatova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

Поступила 03.10.2025

После доработки 22.12.2025

Принята к публикации 13.03.2026

Received October 3, 2025

Revised December 22, 2025

Accepted March 13, 2026

УДК 615.07:579.887:604

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107>

Оригинальная статья | Original article



## Стандартизация микробиологического метода выявления микоплазменной контаминации в биологических лекарственных препаратах: разработка стандартного образца *Acholeplasma laidlawii* PG8

С.М. Суханова , З.Е. Бердникова , О.В. Фадейкина 

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

✉ Суханова Светлана Михайловна; [suhanovasm@expmed.ru](mailto:suhanovasm@expmed.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Выявление микоплазм является одной из наиболее сложных проблем при контроле микробной контаминации биологических лекарственных препаратов (БЛП). Для обнаружения микоплазм в БЛП и стандартизации микробиологического метода контроля необходимы высокочувствительные питательные среды и фармакопейные стандартные образцы (ФСО) тест-штаммов различных видов микоплазм.

**ЦЕЛЬ.** Разработка и аттестация нового фармакопейного стандартного образца *Acholeplasma laidlawii* PG8 для проведения испытаний биологических лекарственных препаратов на присутствие микоплазм микробиологическим методом.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Разработку ФСО проводили согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) с использованием штамма *A. laidlawii* PG8 (ГКПМ 930002, ATCC 23206, NCTC 10116), питательной среды Каган, сыворотки крови лошади. Аттестация ФСО включала определение значения титра штамма *A. laidlawii* PG8 методом наиболее вероятных чисел и испытания по следующим показателям качества: «Описание», «Наличие вакуума», «Время растворения», «Внешний вид растворенного образца», «Стерильность», «Потеря в массе при высушивании», «Однородность массы (средняя масса и отклонение от средней массы)».

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Проведена разработка ФСО *A. laidlawii* PG8 и составлена спецификация ФСО. Приготовлены лиофилизированные образцы основного и рабочего банков культуры *A. laidlawii* PG8. Установлено, что процедура лиофилизации не оказывает существенного воздействия на жизнеспособность штамма. Показана стабильность значений титра штамма ( $10^8$  КОЕ/мл), культуральных и физико-химических свойств образцов по критически важным для обеспечения качества и надежности показателям в течение двух лет хранения при температуре минус 20–30°C. Аттестованы три серии ФСО *A. laidlawii* PG8. Значения титра серий ФСО варьировались от  $10 \times 10^8$  до  $21 \times 10^8$  КОЕ/мл. Показана сопоставимость разработанного ФСО со стандартным образцом Европейской фармакопеи BRP *A. laidlawii*, серия 1 (титр  $2,45 \times 10^6$  КОЕ/мл). На основании результатов исследований ФСО *A. laidlawii* PG8 включен в Реестр ФСО ГФ РФ.

**ВЫВОДЫ.** Разработан и аттестован новый ФСО *A. laidlawii* PG8. ФСО может быть использован для оценки ростовых свойств питательных сред, определения наличия ингибирующего действия, а также в качестве положительного контроля при испытаниях БЛП и биологических материалов, применяемых в их производстве, на присутствие микоплазм микробиологическим методом согласно требованиям ГФ РФ. Внедрение ФСО будет способствовать стандартизации и повышению качества контроля БЛП, а также гармонизации требований ГФ РФ с международными стандартами.

**Ключевые слова:** микоплазмы; *Acholeplasma laidlawii*; микробная контаминация; биологические лекарственные препараты; контроль качества; стандартный образец; ФСО; микробиологический метод; питательная среда; стандартизация; гармонизация

**Для цитирования:** Суханова С.М., Бердникова З.Е., Фадейкина О.В. Стандартизация микробиологического метода выявления микоплазменной контаминации в биологических лекарственных препаратах: разработка стандартного образца *Acholeplasma laidlawii* PG8. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(1):97–107. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00061-26-00 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.

## Standardizing microbiological method to detect mycoplasma contamination in biological products: development of *Acholeplasma laidlawii* PG8 reference standard

Svetlana M. Sukhanova , Zinaida E. Berdnikova , Olga V. Fadeikina 

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

✉ Svetlana M. Sukhanova; [suhanovasm@expmed.ru](mailto:suhanovasm@expmed.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Mycoplasmas are one of the most challenging types of microbial contamination to detect in biological products (BP). Detecting micoplasmas in the BPs and standardizing microbiological control method necessitates highly sensitive culture media and pharmacopeial reference standards (RS) for test strains of various mycoplasmas.

**AIM.** This study aimed to develop and certify the new pharmacopeial reference standard *Acholeplasma laidlawii* PG8 for mycoplasma identification in the BPs using the microbiological method.

**MATERIALS AND METHODS.** *A. laidlawii* PG8 (NCPM 930002, ATCC 23206, NCTC 10116) strain, Kagan's medium, and horse serum was used to develop the reference standard in compliance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (SP RF). The certification included determination of strain titre by the most probable number method and quality tests for: Description, Vacuum, Reconstitution time, Description of dissolved sample, Sterility, Loss on drying, and Mass homogeneity (average mass and average deviation).

**RESULTS.** Development and specification of *A. laidlawii* PG8 reference standard was completed. Lyophilised samples of the master and working bank of *A. laidlawii* PG8 strain culture were prepared. It was established that the lyophilization process does not significantly affect strain viability. The stability of strain titers ( $10^8$  CFU/mL), cultural, and physicochemical properties of the samples was demonstrated for critical quality and reliability indicators during two years of storage at  $-20$  to  $-30^\circ\text{C}$ . Three batches of *A. laidlawii* PG8 RS were certified. The calculated titer values ranged from  $10 \times 10^8$  to  $21 \times 10^8$  CFU/mL. The pharmacopoeial reference standard is found to be comparable to the European Pharmacopoeia reference standard *A. laidlawii* BRP, batch 1 (titer  $2.45 \times 10^6$  CFU/mL). As a result of the conducted research, *A. laidlawii* PG8 RS was included in the Register and Collection of Reference Standards of the Russian Pharmacopoeia.

**CONCLUSIONS.** A new *A. laidlawii* PG8 reference standard has been developed and certified that can be used to evaluate the nutritive properties of culture media; determine the inhibitory effects; and serve as a positive control in BP and material tests for the presence of mycoplasmas using the microbiological method in accordance with SP RF requirements. Introducing the new RS will contribute to standardization and improve BP control, as well as harmonization of the Russian compendial requirements with the international standards.

**Keywords:** mycoplasma; *Acholeplasma laidlawii*; microbial contamination; biological products; quality control; reference standard; pharmacopoeial reference standard; microbiological method; culture media; standardization; harmonization

**For citation:** Sukhanova S.M., Berdnikova Z.E., Fadeikina O.V. Standardizing microbiological method to detect mycoplasma contamination in biological products: development of *Acholeplasma laidlawii* PG8 reference standard. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(1):97–107. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107>

**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. 056-00061-26-00 (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

Надежность и достоверность выявления микоплазменной контаминации на всех этапах производства биологических лекарственных препаратов (БЛП) необходимы для обеспечения их качества и безопасности. Микоплазмы способны инфицировать клеточные культуры и вакцинные препараты, изменяя характеристики культуры, используемой для производства вакцин, и конечного продукта, что обуславливает необходимость применения особых приемов для их выявления<sup>1</sup> [1–6].

Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ)<sup>2</sup>, Европейская фармакопея<sup>3</sup>, Фармакопея США<sup>4</sup>, Британская<sup>5</sup>, Индийская<sup>6</sup> и Китайская фармакопеи<sup>7</sup> рекомендуют для обнаружения микоплазм в загрязненных клеточных субстратах и вирусных штаммах применять метод прямого культивирования и метод индикаторной клеточной культуры. Международные экспертные организации, включая Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ)<sup>8</sup>, Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency)<sup>9</sup>, Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation

of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)<sup>10</sup>, рассматривают метод прямого культивирования как основной для тестирования банка клеток, посевной партии вирусов, контрольных клеточных культур, контроля вирусного сбора, нерасфасованной (bulk) партии или готовой серии вакцины<sup>11</sup> [4].

Проведение испытаний предполагает использование питательных сред, характеристики которых зависят от качества биологических компонентов, что влияет на результаты. Поэтому обязательным условием испытаний является достаточный рост штаммов микоплазм на выбранной питательной среде (ПС). Используемые микроорганизмы должны представлять распространенные виды-контаминанты клеточных культур [7]: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma gallisepticum*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. synoviae*. Для адекватной оценки исследуемых образцов в качестве тест-штаммов рекомендуется применять микроорганизмы, выделенные из патогенного материала, или использовать соответствующие фармакопейные стандартные образцы (ФСО), например стандартные образцы (СО) биологических препаратов Европейской фармакопеи (biological reference preparations, BRP)<sup>12</sup> с ограниченным числом пассажей [8]. Стандартизация методов контроля

<sup>1</sup> ГОСТ Р 70610-2022. Национальный стандарт Российской Федерации. Яйца куриные инкубационные для иммунобиологических производств. Технические условия.

<sup>2</sup> ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

<sup>3</sup> 2.6.7. Mycoplasmas. European Pharmacopoeia. 11th ed. Suppl. 11.5; 2024.

<sup>4</sup> <63> USP 46–NF41 Mycoplasma tests. United State Pharmacopeia; 2025.

<sup>5</sup> Test for absence of mycoplasmas. British Pharmacopoeia. Vol. 1; 2024.

<sup>6</sup> 2.7.4. Test for absence of mycoplasmas. Indian Pharmacopoeia. Vol. 1; 2022.

<sup>7</sup> 3301 Test for mycoplasma. Pharmacopoeia of the Peoples' Republic of China. Vol. III; 2020.

<sup>8</sup> Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards, Annex 2, TRS No 932. WHO; 2004.

<sup>9</sup> VICH GL34: Biologicals: testing for the detection of Mycoplasma contamination (EMA/CVMP/VICH/463/2002). EMA; 2013.

<sup>10</sup> Руководства ICH для фармацевтической отрасли. Качество: практическое руководство. СПб: ЦОП «Профессия»; 2017.

<sup>11</sup> ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

<sup>12</sup> 2.6.7. Mycoplasmas. European Pharmacopoeia. 11th ed. Suppl. 11.5; 2024.

<63> USP46–NF41 Mycoplasmas. United State Pharmacopeia; 2025.

<sup>12</sup> Ph. Eur. Reference Standard – LEAFLET. *Acholeplasma laidlawii* BRP batch 1. [https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693\\_1.pdf](https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693_1.pdf)

БЛП и материалов, используемых в процессе их производства, представляет собой эффективный способ обеспечения качества и безопасности выпускаемого продукта<sup>13</sup>. Применение СО для оценки пригодности ПС и определения наличия антимикробного действия самого БЛП позволяет повысить сопоставимость и воспроизводимость результатов для более полной и объективной оценки качества, а также упростить процедуру анализа.

Согласно требованиям ГФ РФ для проведения испытания на присутствие микоплазм рекомендовано использовать СО штаммов, прежде всего *Mycoplasma arginini* G230, или, в зависимости от типа испытуемого препарата, другие виды микоплазм<sup>14</sup>, которые на российском рынке отсутствуют. Ранее авторы обосновали необходимость расширения спектра новых СО штаммов, включая широко распространенный штамм, ферментирующий D-глюкозу, и устойчивый к антибиотикам *A. laidlawii* [9].

Создание новых российских ФСО тест-штаммов микоплазм в условиях ограниченного доступа к зарубежным СО является актуальной задачей. Ее решение позволит усовершенствовать существующую методику испытаний и гармонизировать требования ГФ РФ с международными стандартами.

Цель работы – разработка и аттестация нового фармакопейного стандартного образца *Acholeplasma laidlawii* PG8 для проведения испытаний БЛП на присутствие микоплазм микробиологическим методом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

В работе использовали штамм *A. laidlawii* PG8 (ГКПМ 930002, АТСС 23206, NCTC 10116) из коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), полученный из лаборатории микоплазм и L-форм бактерий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (штамм предоставлен Aarhus University, Дания). Использовали лиофилизированные образцы серии «0» (основной банк) и трех

рабочих серий кандидата в ФСО – тест-штамма *A. laidlawii* PG8 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); питательные среды: жидкую и полужидкую Каган (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), согласно требованиям ГФ РФ<sup>15</sup>; сыворотку крови лошади нормальную для культивирования микоплазм (кат. № 1.1.5.2, ООО «БиолоТ», Россия); ФСО.3.2.00378 *M. arginini* 230 с действующим сроком годности (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); стандартный образец Европейской фармакопеи BRP *A. laidlawii*, серия 1<sup>16</sup>.

### Оборудование

Использовали аттестованное оборудование: термостат ТС-1/20 СПУ («Смоленское СКТБ СПУ», Россия); термощаф (инкубатор) тип В 115 (Binder GmbH); шкаф ламинарный II класса БАВп-01-1,2 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия); морозильная камера «Саратов 127» (ООО «СЭПО-ЗЭМ», Россия); дозатор пипеточный с переменным объемом доз, одноканальный (ДПОПц-1-10-5000, ООО «Ленпипет», Россия).

### Методы

Лиофилизацию культуры штамма *A. laidlawii* PG8 проводили на аппарате Epsilon 2-4 LSCplus (Martin Christ, Германия). Образцы хранили при температуре минус 20–30°C.

Качество лиофилизированных образцов оценивали по следующим показателям:

- «Описание», «Время растворения» и «Внешний вид восстановленного образца» – визуально;
- «Наличие вакуума» (в упаковке для контроля попадания воздуха и предотвращения ухудшения свойств культуры) – визуально в поле высокочастотного разряда<sup>17</sup>;
- «Стерильность» (отсутствие посторонней микрофлоры) – методом прямого посева<sup>18</sup>;
- «Потеря в массе при высушивании» – весовым методом<sup>19</sup>;
- «Однородность массы (средняя масса и отклонение от средней массы)» – весовым методом<sup>20</sup> (для оценки точности проводимого розлива, косвенно показывающего равномерность распределения клеток между экземплярами серии).

<sup>13</sup> ГОСТ ISO Guide 35-2015. Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации).

<sup>14</sup> ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

<sup>15</sup> Там же.

<sup>16</sup> Ph. Eur. Reference Standard – LEAFLET. *Acholeplasma laidlawii* BRP batch 1. [https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693\\_1.pdf](https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693_1.pdf)

<sup>17</sup> ОФС.1.8.1.0002 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

<sup>18</sup> ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

<sup>19</sup> ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.

<sup>20</sup> ОФС.1.4.2.0009 Однородность массы дозированных лекарственных форм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.

Значение титра (количественный показатель концентрации живых клеток) определяли на полужидкой ПС методом наиболее вероятных чисел (НВЧ), используя десятикратные разведения. Каждое разведение высевали в три пробирки и инкубировали при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 7 сут. Регистрировали предельные контрольные разведения, в которых отмечали наличие роста микоплазм, принимая их за значение титра. Расчет титра проводили методом предельных разведений с использованием таблицы Мак-Креди<sup>21</sup>. При аттестации титр штамма серии «0» (основной банк) устанавливали посевом 10 образцов на двух партиях ПС, а трех рабочих серий – посевом 5 образцов с последующим расчетом среднего арифметического значения КОЕ/мл.

**Критерии приемлемости результатов значения титра.** С учетом специфики методики и изменчивого состава ПС значения коэффициента титра в пределах одного порядка (например,  $2,5\times 10^8$ ,  $4,5\times 10^8$ ) считали сопоставимыми. Анализ проводили по значениям контрольных разведений (не менее  $10^7$ ) без учета коэффициента.

**Оценку стабильности** образцов проводили после лиофилизации и через 6, 12, 18 и 24 мес. хранения при температуре минус  $20-30^\circ\text{C}$ .

**Ростовые свойства питательных сред** определяли согласно требованиям ГФ РФ<sup>22</sup> с использованием ФСО.3.2.00378 *M. arginini* 230.

**Статистическая обработка результатов.** Рассчитывали среднее арифметическое значение ( $X_{cp}$ ) НВЧ микроорганизмов и относительное стандартное отклонение [10].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ стандартного образца Европейской фармакопеи *A. laidlawii*

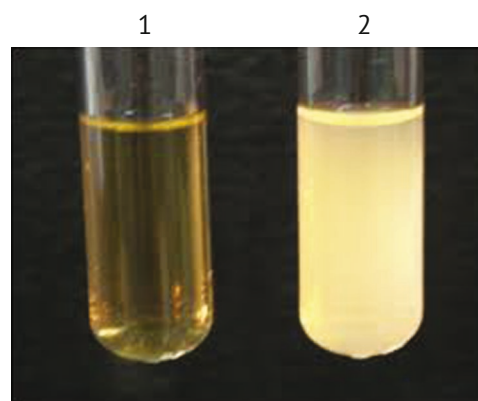
С учетом значимости Европейской фармакопеи для гармонизации российских фармакопейных стандартов в работе были определены основные характеристики BRP *A. laidlawii*<sup>23</sup>. Экспертный совет Европейской фармакопеи рекомендовал его в качестве тестового микроорганизма для проверки ростовых свойств ПС при испытании методом прямого посева, особенно для вакцин, в производстве которых использовались антибиотики<sup>24</sup>. Установлено, что BRP *A. laidlawii*, серия 1, представляет собой замороженную суспензию штамма, прошедшего

менее 15 пассажей от исходного клона, выделенного из культуры кератиновых клеток [8]. Предполагаемый расчетный титр серии составляет  $2,45\times 10^6$  КОЕ/мл, с допустимым диапазоном от  $3,89\times 10^5$  до  $1,55\times 10^7$  КОЕ/мл, в условиях хранения при температуре не выше минус  $60^\circ\text{C}$ . При подготовке к испытанию в образце подтверждают титр и используют установленное разведение (согласно Европейской фармакопее, не более 100 КОЕ) для посева на ПС.

### Приготовление и изучение свойств образцов штамма *A. laidlawii* PG8 серии «0» – кандидата в ФСО

Для получения серии кандидата в ФСО лиофилизированную культуру штамма *A. laidlawii* PG8 (ГКПМ 930002, ATCC 23206, NCTC 10116) инкубировали в ПС с сывороткой крови лошади при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Через 24–48 ч наблюдали микробный рост, характеризующийся незначительным помутнением и равномерной опалесценцией среды по сравнению с прозрачной контрольной средой. Морфологические свойства соответствовали паспортным данным штамма<sup>25</sup>.

Для накопления биомассы культуру инкубировали до 4 сут, отмечая при этом увеличение помутнения (рис. 1). Затем полученную суспензию разделяли на аликвоты объемом 1 мл и подвергали лиофилизации. Приготовленные



Фотография выполнена авторами / The photograph was taken by the authors

**Рис. 1.** Рост штамма *A. laidlawii* PG8 серии «0» на жидкой питательной среде Каган: 1 – контроль (незасеянная среда), 2 – культура *A. laidlawii* PG8.

**Fig. 1.** Growth of *A. laidlawii* PG8 strain (series "0") on liquid Kagan's medium: 1, control (uninoculated medium), 2, *A. laidlawii* PG8 culture.

<sup>21</sup> ГОСТ 54653-2011. Удобрения органические. Методы микробиологического анализа.

<sup>22</sup> ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

<sup>23</sup> Ph. Eur. Reference Standard – LEAFLET. *Acholeplasma laidlawii* BRP batch 1. [https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693\\_1.pdf](https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693_1.pdf)

<sup>24</sup> 2.6.7. Mycoplasmas. European Pharmacopoeia. 11th ed. Suppl. 11.5; 2024.

<sup>25</sup> Паспорт штамма *Acholeplasma laidlawii* ГКПМ 930002. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

образцы герметизировали и хранили при температуре минус 20–30°C. Изучали морфологические свойства и определяли титр образцов штамма до и после лиофилизации согласно ГФ РФ на полужидкой ПС Каган<sup>26</sup>. Значения титра, рассчитанного на двух партиях ПС до и после лиофилизации, представлены в *таблицах 1 и S1* (опубликована на сайте журнала<sup>27</sup>).

Для оценки влияния лиофилизации на концентрацию штамма проведен сравнительный анализ титра для исходного образца и образца, подвергнутого процедуре лиофилизации. Анализ показал незначительные различия полученных значений в пределах одного порядка: от  $2,5 \times 10^8$  до  $15,0 \times 10^8$  КОЕ/мл до лиофилизации и от  $5,2 \times 10^8$  до  $9,3 \times 10^8$  КОЕ/мл после лиофилизации (*табл. 1, S1*). Это свидетельствует о приемлемости и сходимости полученных результатов. При оценке влияния среды (две партии ПС) показана стабильность среднего значения НВЧ на уровне около 108 КОЕ/мл. Рост микоплазм наблюдался при максимальных разведениях  $10^{-8}$ – $10^{-9}$ , что свидетельствовало о минимальном влиянии лиофилизации на жизнеспособность культуры.

Лиофилизованные образцы были дополнительно охарактеризованы по показателям

«Потеря в массе при высушивании» и «Однородность массы». Значение показателя «Потеря в массе при высушивании» составило 3,53% при норме не более 5%<sup>28</sup>. Однородность массы, оцененная как относительное стандартное отклонение от средней массы образца, была равна 1,62% при средней массе образца  $1,0042 \pm 0,0163$  г<sup>29</sup>. Полученные результаты подтвердили соответствие лиофилизатов требованиям ГФ РФ<sup>30</sup>.

При изучении воздействия условий хранения на устойчивость характеристик культуры было установлено, что после 6 мес. хранения при температуре минус 20–30°C параметры образцов оставались сопоставимы с исходными. Титр сохранился на уровне  $15 \times 10^8$  КОЕ/мл (*табл. S2*, опубликована на сайте журнала<sup>31</sup>). Среднее содержание клеток в 1 мл культуры варьировало в узком диапазоне в пределах  $10^8$ , что свидетельствовало об однородности суспензии, точности розлива и высокой выживаемости культуры *A. laidlawii* PG8. Расчет титра образцов серии «0» после 6 мес. хранения представлен в *таблице S2*.

Анализ показателей качества образцов серии «0», включая сохранение концентрации микробных клеток на уровне  $10^8$ – $10^9$  КОЕ/мл в течение

**Таблица 1.** Определение титра штамма *A. laidlawii* PG8 серии «0» по таблице Мак-Креди (до лиофилизации)

**Table 1.** Titre determination of *A. laidlawii* PG8 strain, batch "0", using McCrady's table (prior to lyophilisation)

Номер пробирки <i>Test tube number</i>	Разведение <i>Dilution</i>	Наличие роста <i>A. laidlawii</i> PG8 на 7 сут инкубации (три повторности) <i>Growth of the A. laidlawii PG8 on Day 7 of incubation (in triplicate)</i>	
		Партия среды 79 <i>Medium batch 79</i>	Партия среды 154 <i>Medium batch 154</i>
1–8	$10^{-1}$ – $10^{-8}$	+++	+++
9	$10^{-9}$	---	++-
10	$10^{-10}$	---	---
Предельное разведение <i>Limiting dilution</i>		$10^{-8}$	$10^{-9}$
Числовая характеристика (Мак-Креди) <i>Numerical interpretation (McCrady)</i>		300	320
НВЧ в трех повторностях, КОЕ/мл <i>MPN in triplicate, CFU/mL</i>		$2,5 \times 10^8$	$15,0 \times 10^8$
Среднее арифметическое НВЧ, КОЕ/мл <i>MPN arithmetic mean, CFU/mL</i>		$8,7 \times 10^8$	

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

*Примечание.* «+» – наличие роста микоплазм; «-» – отсутствие роста микоплазм; НВЧ – наиболее вероятное число; КОЕ – колониеобразующая единица.

*Note.* +, growth of mycoplasmas; -, no growth of mycoplasmas; MPN, most probable number; CFU, colony-forming unit.

<sup>26</sup> ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

<sup>27</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s1>

<sup>28</sup> ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.

<sup>29</sup> ОФС.1.4.2.0009 Однородность массы дозированных лекарственных форм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.

<sup>30</sup> ОФС.1.4.1.0031 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.

<sup>31</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s2>

6 мес. хранения, и сравнение с характеристиками BRP *A. laidlawii*, серия 1<sup>32</sup>, позволили установить ключевые критерии оценки качества СО. На основании этого разработана спецификация и изготовлены три рабочие серии образцов из серии «0» (основной банк штамма *A. laidlawii* PG8) для дальнейших исследований стабильности.

#### Разработка спецификации ФСО *A. laidlawii* PG8

С учетом российских и международных требований к СО БЛП и лиофилизатам<sup>33</sup> [11, 12], опыта аттестации и применения ФСО.3.2.00378 *M. arginini* 230 [9, 13], а также характеристик BRP *A. laidlawii*<sup>34</sup>, авторами были установлены требования к показателям качества и составлена спецификация ФСО ГФ РФ *A. laidlawii* PG8. В спецификацию включены методы анализа, нормы и критические показатели для оценки качества образцов и проведения их аттестации на соответствие требованиям к ФСО (табл. 2).

Дальнейшую аттестацию и оценку образцов проводили согласно разработанной спецификации.

#### Приготовление рабочих серий штамма

##### *A. laidlawii* PG8 и аттестация кандидатов в ФСО

Рабочие серии получали из образцов основного банка после 6 мес. хранения по аналогичной процедуре. При высеве разведений  $10^{-1}$ – $10^{-9}$  на полужидкую ПС образцов всех трех серий через 96 ч (4 сут) инкубации наблюдали характерный рост в виде колоний светло-желтого цвета как в зоне посева, так и по всей глубине ПС, соответствующий паспортным данным и культуральным свойствам образцов основного банка (рис. 2).

В рамках аттестации образцы трех рабочих серий были проанализированы по параметрам спецификации. Результаты аттестации показали их сопоставимость и воспроизводимость, в первую очередь по титру штамма (табл. 3).

Оценка значения титра до и после лиофилизации подтвердила незначительное влияние процедуры на устойчивость культуры *A. laidlawii* PG8 (табл. 4).

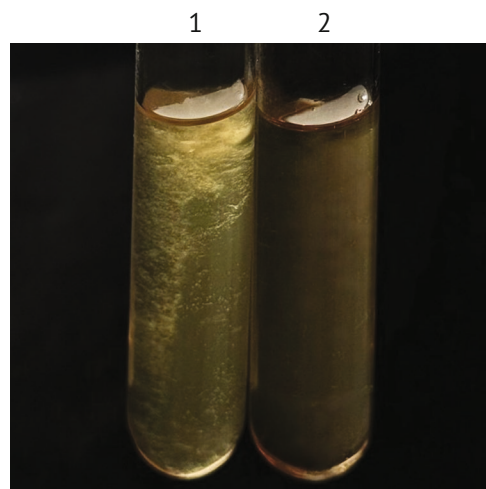
Для проверки пригодности полученных образцов согласно процедуре, принятой в Европейской фармакопее [8], образцы были переданы на экспертизу в независимую

лабораторию (Департамент контроля качества ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России). Результаты экспертизы подтвердили полное соответствие качества образцов рабочей серии 1 заявленным требованиям спецификации: выявление характерного роста тест-штамма после инкубации рабочих разведений на полужидкой среде Каган в течение 7 сут при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

В связи с отсутствием отклонений от установленных нормативных требований, серии были признаны пригодными в качестве ФСО для исследования стабильности.

#### Изучение стабильности свойств образцов основного банка и рабочих серий тест-штамма *A. laidlawii* PG8

Стабильность лиофилизированных образцов основного банка и трех рабочих серий *A. laidlawii* PG8 оценивали после 6, 12, 18 и 24 мес. хранения при температуре минус  $20$ – $30^\circ\text{C}$  на пяти случайно отобранных образцах каждой серии (табл. 4). Условия хранения не оказали значимого влияния на культуральные свойства.



Фотография выполнена авторами / The photograph was taken by the authors

**Рис. 2.** Рост штамма *A. laidlawii* PG8 рабочей серии 1 на полужидкой питательной среде Каган: 1 – культура *A. laidlawii* PG8, 2 – контроль (незасеянная среда).

**Fig. 2.** Growth of *A. laidlawii* PG8 strain (working bank batches 1) on semi-liquid Kagan's medium: 1, *A. laidlawii* PG8 culture, 2, control (uninoculated medium).

<sup>32</sup> Ph. Eur. Reference Standard – LEAFLET. *Acholeplasma laidlawii* BRP batch 1. [https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693\\_1.pdf](https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693_1.pdf)

<sup>33</sup> Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. Annex 2. TRS No 932. WHO; 2004.

ГОСТ ISO Guide 35-2015. Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации).

ОФС.1.4.1.0031 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.

<sup>34</sup> Ph. Eur. Reference Standard – LEAFLET. *Acholeplasma laidlawii* BRP batch 1. [https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693\\_1.pdf](https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693_1.pdf)

**Таблица 2.** Спецификация фармакопейного стандартного образца *A. laidlawii* PG8  
**Table 2.** Specification of *A. laidlawii* PG8 reference standard

Показатель <i>Parameter</i>	Метод <i>Method</i>	Норма <i>References</i>
Описание (внешний вид) лиофилизата <i>Description before reconstitution</i>	Визуальный <i>Visual</i>	Лиофилизированная мелкопористая масса светло-желтого цвета в виде рыхлой таблетки <i>Light-yellow finely porous lyophilised mass in the form of a friable tablet</i>
Наличие вакуума (герметизация) <i>Vacuum (container integrity)</i>	Визуальный (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.7.1.0018.18) <i>Visual (SP RF XV, OFS. 1.7.1.0018.18)</i>	Свечение в поле высокочастотного разряда должно быть голубым или розово-голубым <i>Blue or pink and blue glow in the high-frequency discharge</i>
Время растворения <i>Reconstitution time</i>	Визуальный <i>Visual</i>	Время растворения в 1 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида не должно превышать 1 мин <i>Reconstitution time in 1 mL sterile 0.9% sodium chloride solution is less than 1 min</i>
Описание восстановленного образца <i>Description after reconstitution</i>	Визуальный <i>Visual</i>	Суспензия светло-желтого цвета, без осадка и примесей <i>Light-yellow suspension free of precipitation and impurities</i>
Стерильность <i>Sterility</i>	Метод прямого посева (ГФ РФ XIV изд., ОФС.1.2.4.0003.15) <i>Direct inoculation (SP RF XIV, OFS.1.2.4.0003.15)</i>	Бактерии и грибы должны отсутствовать <i>No bacteria or fungi present</i>
Однородность массы дозированной лекарственной формы (средняя масса и отклонение от средней массы) <i>Mass homogeneity of the weighed dosage forms (average mass and deviation)</i>	Весовой (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.4.2.0009) <i>Weighing (SP RF XV, OFS.1.4.2.0009)</i>	Не более 5% <i>Not more than 5%</i>
Потеря в массе при высушивании <i>Loss on drying</i>	Весовой (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.2.1.0010) <i>Weighing (SP RF XV, OFS.1.2.1.0010)</i>	Не более 5% <i>Not more than 5%</i>
Титр, КОЕ/мл <i>Titre, CFU/mL</i>	Метод предельных разведений с составлением числовой характеристики по таблице Мак-Креди или по среднему арифметическому значению <i>Titre calculation by the most probable number method, with numerical interpretation using McCrady's table or the arithmetic mean</i>	Не ниже $1 \times 10^7$ <i>Not less than <math>1 \times 10^7</math></i>

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

*Примечание.* ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации, ОФС – общая фармакопейная статья, КОЕ – колониеобразующая единица.

*Note.* SP RF, State Pharmacopoeia of the Russian Federation; OFS, general pharmacopoeial chapter; CFU, colony-forming unit.

Характер и скорость микробного роста во всех образцах в течение срока хранения оставались неизменными и соответствовали паспортным данным штамма. Титр штамма без учета числовых значений коэффициента стабильно сохранялся в пределах одного порядка ( $10^8$  КОЕ/мл). Количественные показатели также демонстрировали сравнимые значения в пределах неопределенности измерений.

Таким образом, в течение двух лет хранения характеристики всех серий образцов штамма *A. laidlawii* PG8 оставались стабильными и соответствовали спецификации.

На основании результатов аттестации разработаны Паспорт и Инструкция по применению ФСО *A. laidlawii* PG8. Данный ФСО, предназначенный для контроля БЛП на присутствие микоплазм в соответствии с требованиями ОФС.1.7.2.0031.15<sup>35</sup>, утвержден Приказом № 297 от 25.12.2024 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России и внесен в Реестр ФСО ГФ РФ под реестровым номером ФСО.3.2.0047<sup>36</sup>.

Разработанный ФСО *A. laidlawii* PG8 предназначен для использования в испытаниях БЛП на присутствие микоплазм микробиологическим методом согласно требованиям ОФС.1.2.4.003.15.

<sup>35</sup> ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.

<sup>36</sup> Реестр Фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации.  
<https://www.regmed.ru/produkt-n-service/fso/fso-registry/fso-of-biological-origin/>

**Таблица 3.** Результаты аттестации образцов рабочих серий 1, 2 и 3 тест-штамма *A. laidlawii* PG8  
**Table 3.** Certification results of working bank batches 1, 2, 3, test strain *A. laidlawii* PG8

Показатель <i>Parameter</i>	Требование спецификации <i>Specification requirement</i>	Результат аттестации образцов <i>Samples</i>		
		Рабочая серия 1 <i>Batch 1</i>	Рабочая серия 2 <i>Batch 2</i>	Рабочая серия 3 <i>Batch 3</i>
Описание лиофилизата <i>Description before reconstitution</i>	Лиофилированная мелкопористая масса светло-желтого цвета в виде рыхлой таблетки <i>Light-yellow finely porous lyophilised mass in the form of a friable tablet</i>	Соответствует <i>Complies</i>	Соответствует <i>Complies</i>	Соответствует <i>Complies</i>
Описание восстановленного образца <i>Description after reconstitution</i>	Суспензия светло-желтого цвета, без осадка и примесей <i>Light-yellow suspension free of precipitation and impurities</i>	Соответствует <i>Complies</i>	Соответствует <i>Complies</i>	Соответствует <i>Complies</i>
Наличие вакуума <i>Presence of vacuum</i>	Свечение в поле высокочастотного разряда должно быть голубым или розово-голубым <i>Blue or pink-blue glow in the high-frequency discharge</i>	Розово-голубое свечение <i>Pink and blue glow</i>	Розово-голубое свечение <i>Pink and blue glow</i>	Розово-голубое свечение <i>Pink and blue glow</i>
Время растворения <i>Reconstitution time</i>	Время растворения в 1 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида не должно превышать 1 мин <i>Reconstitution time in 1 mL sterile 0.9% sodium chloride less than 1 min</i>	Соответствует <i>Complies</i>	Соответствует <i>Complies</i>	Соответствует <i>Complies</i>
Стерильность <i>Sterility</i>	Посторонние бактерии и грибы должны отсутствовать <i>No extraneous bacteria or fungi present</i>	Соответствует <i>Complies</i>	Соответствует <i>Complies</i>	Соответствует <i>Complies</i>
Средняя масса (г) и отклонение от средней массы (RSD, %) <i>Average mass (g) and deviation (RSD, %)</i>	Не более 5% <i>Not more than 5%</i>	0,05272±0,00079 RSD=1,5%	0,0505±0,00111 RSD=2,1%	0,0489±0,0019 RSD=3,8%
Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Не более 5% <i>Not more than 5%</i>	2,91	1,9	2,9
Титр, КОЕ/мл <i>Titre, CFU/mL</i>	Не ниже 1×10 <sup>7</sup> <i>Not less than 1×10<sup>7</sup></i>	21×10 <sup>8</sup>	19×10 <sup>8</sup>	10×10 <sup>8</sup>

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

*Примечание.* КОЕ – колониеобразующая единица; RSD – относительное стандартное отклонение.  
*Note.* CFU, colony-forming unit; RSD, relative standard deviation.

С помощью ФСО возможна оценка пригодности партии питательной среды с уровнем чувствительности не более 100 КОЕ. В испытаниях могут применяться любые ПС, обладающие рост-стимулирующими свойствами в отношении *A. laidlawii* PG8, включая рекомендованную ГФ РФ полужидкую среду Каган. Данная среда обеспечивает минимальные анаэробные условия, благоприятные для выделения и культивирования как аргининзависимых (*M. arginini* G230), так и глюкозоферментирующих (*A. laidlawii* PG8) микоплазм, а также среда позволяет использовать лиофилизованные образцы ФСО *A. laidlawii* PG8 без предварительного накопления на других средах, что упрощает методику тестирования образцов.

Введение ФСО *A. laidlawii* PG8 в процедуру микробиологических испытаний БЛП расширяет спектр обнаруживаемой контаминации. ФСО может применяться для оценки качества лекарственных средств и ветеринарных препаратов, в производстве которых использовались антибиотики, а также для оценки иных материалов животного и растительного происхождения, включая сухие питательные среды, потенциально контаминированные микоплазмами. В качестве альтернативы не исключается возможность использования ФСО тест-штамма *A. laidlawii* PG8 при разработке метода ПЦР диагностики микоплазменной контаминации в различных материалах биологического происхождения.

**Таблица 4.** Стабильность титра тест-штамма *A. laidlawii* PG8 после хранения при температуре минус 20–30 °С  
**Table 4.** Assessment of the culture titre stability of strain *A. laidlawii* PG8 stored at -20 to -30 °C

Серия <i>Batch</i>	Титр штамма <i>A. laidlawii</i> PG8, КОЕ/мл <i>The strain titer A. laidlawii PG8, CFU/mL</i>					
	Микробная суспензия до лиофилизации <i>Microbial suspension prior to lyophilisation</i>	Образцы после лиофилизации <i>Samples, post-lyophilisation</i>	Образцы после 6 мес. хранения <i>6 months of storage</i>	Образцы после 12 мес. хранения <i>12 months of storage</i>	Образцы после 18 мес. хранения <i>18 months of storage</i>	Образцы после 24 мес. хранения <i>24 months of storage</i>
Основной банк <i>Master bank</i>	12×10 <sup>8</sup>	7,2×10 <sup>8</sup>	15×10 <sup>8</sup>	10×10 <sup>8</sup>	2,9×10 <sup>8</sup>	2,9×10 <sup>8</sup>
Рабочая серия 1 <i>Working bank batch 1</i>	25×10 <sup>8</sup>	21×10 <sup>8</sup>	23×10 <sup>8</sup>	23×10 <sup>8</sup>	21×10 <sup>8</sup>	73×10 <sup>8</sup>
Рабочая серия 2 <i>Working bank batch 2</i>	45×10 <sup>8</sup>	19×10 <sup>8</sup>	18×10 <sup>8</sup>	73×10 <sup>8</sup>	67×10 <sup>8</sup>	44×10 <sup>8</sup>
Рабочая серия 3 <i>Working bank batch 3</i>	25×10 <sup>8</sup>	10×10 <sup>8</sup>	13×10 <sup>8</sup>	10×10 <sup>8</sup>	25×10 <sup>8</sup>	11×10 <sup>8</sup>

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

## ВЫВОДЫ

1. Приготовлены лиофилизованные образцы основного и рабочего банков культуры штамма *A. laidlawii* PG8.
2. Показана стабильность аттестованных значений титра штамма (10<sup>8</sup> КОЕ/мл), культуральных и физико-химических свойств образцов по критически важным для обеспечения качества и надежности показателям в течение двух лет хранения при температуре минус 20–30 °С.
3. Разработан и аттестован новый ФСО *A. laidlawii* PG8 для оценки ростовых свойств питательных сред, определения ингибирующего действия препаратов и использования в качестве положительного контроля при испытаниях на присутствие микоплазм согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации. По характеристикам ФСО *A. laidlawii* PG8 сопоставим со стандартным образцом Европейской фармакопеи BRP *A. laidlawii*, серия 1.
4. На основании результатов аттестации ФСО *A. laidlawii* PG8 включен в Реестр ФСО Государственной фармакопеи Российской Федерации.
5. Внедрение в практику ФСО, предназначенного для стандартизации микробиологического метода выявления контаминации в БЛП, будет способствовать повышению качества контроля БЛП и позволит гармонизировать российские и международные подходы в отношении лекарственных средств, контаминированных различными видами микоплазм.

## Литература/References

1. David SA, Volokhov DV, Ye Z, Chizhikov V. Evaluation of Mycoplasma inactivation during production of biologics: egg-based viral vaccines as a model. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(9):2718–28. <https://doi.org/10.1128/AEM.02776-09>
2. Гладин ДП, Козлова НС, Эйдельштейн ИА и др. Микоплазмы. Биологические свойства (лекция). *Российские биомедицинские исследования.* 2023;8(4):103–15. Gladin DP, Kozlova NS, Edelstein IA, et al. Mycoplasmas. Biological properties (lecture). *Russian Biomedical Research.* 2023;8(4):103–15 (In Russ.). <https://doi.org/10.56871/RBR.2023.58.16.012>
3. Леонович ОА. Микоплазма: свойства, методы обнаружения и дезактивации клеточных культур и штаммов вирусов (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология.* 2024;60(5):435–44. Leonovich OA. Mycoplasma: Properties, detection and decontamination methods of cell cultures and viral strains (review). *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2024;60:785–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0003683824604943>
4. Kalaivani M, Chaudhary P, Goyal M, et al. Current regulatory and pharmacopoeial status of mycoplasma testing in concern with vaccines safety for human use. *J Basic Clin Pharma.* 2021;12(S4):001.
5. Medvedeva ES, Mouzykantov AA, Kostenko VV, et al. Adaptation to antimicrobials and pathogenicity in mycoplasmas: Development of ciprofloxacin-resistance and evolution of virulence in *Acholeplasma laidlawii*. *Dokl Biochem Biophys.* 2021;501(1):444–8. <https://doi.org/10.1134/S1607672921060028>
6. Думченко НБ, Семенцова АО, Нечаева ЕА. Изучение контаминации микоплазменными инфекциями культур клеток насекомых из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. *Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология.* 2023;(3):19–29. Dumchenko NB, Sementsova AO, Nechaeva EA. Research of contamination with mycoplasma infections of cell FBSI SRC VB "Vector" of Rospotrebnadzor. *PNRPU Bulletin. Chemical Technology and*

- Biotechnology*. 2023;(3):19–29 (In Russ.). EDN: [JUJIMN](https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-3-19-29)
7. Rottem S, Kosower NS, Kornspan JD. Contamination of tissue cultures by mycoplasmas. In: Ceccherini-Nelli L, Matteoli B, eds. *Biomedical Tissue Culture*. 2012. <https://doi.org/10.5772/51518>
  8. Milne C, Daas A. Establishment of European Pharmacopoeia mycoplasma reference strains. *Pharmeuropa Bio*. 2006;(1):57–72. PMID: 17270132
  9. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Тихонова АС. Совершенствование методики оценки качества питательной среды для выявления микоплазм. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(3):161–8. Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Tikhonova AS. Ways to improve quality control of culture medium used for mycoplasma detection. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(3):161–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-161-168>
  10. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1994.
  11. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50>
  12. Гегечкори ВИ, Шатилина АА, Шульга НА. Биологические стандартные образцы: актуальные вопросы разработки и порядка аттестации. *Эталон. Стандартные образцы*. 2023;19(3):21–9. Gegechkori VI, Shatilina AA, Shulga NA, et al. Biological reference materials: Topical issues of development and certification procedure. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(3):21–9 (In Russ.). EDN: [RKQAVM](https://doi.org/10.1007/s11094-017-1680-6)
  13. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Фадейкина ОВ и др. Анализ стабильности стандартного образца тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230, используемого при испытании на присутствие микоплазм биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):331–46. Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Fadeikina OV, et al. Stability analysis of a standard sample of the *Mycoplasma arginini* G230 used in testing for the presence of mycoplasmas of biological drugs. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):331–46 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-331-346>

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены *таблицы S1 и S2*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s2>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.М. Суханова** – сбор и анализ источников литературы, систематизация и интерпретация результатов, формулировка выводов, научное редактирование и критическая переработка текста рукописи; **З.Е. Бердникова** – идея исследования, выполнение экспериментальных работ, написание текста рукописи; **О.В. Фадейкина** – концепция и дизайн исследования, статистическая обработка результатов.

**Благодарности.** Коллектив авторов выражает искреннюю благодарность и признательность сотрудникам и руководству иммунобиологического сектора Департамента контроля качества ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России, принявших участие в апробации стандартного образца.

**Additional information.** Tables *S1* and *S2* are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s2>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **S.M. Sukhanova** analysed, systematised and interpreted the results, formulated the conclusions, collected and analysed literature data, edited and critically revised the manuscript; **Z.E. Berdnikova** conceived the study idea, conducted the experiments, and drafted the manuscript; **O.V. Fadeikina** elaborated study concept and design, statistically processed the results, and drafted the manuscript.

**Acknowledgments.** The authors express their sincere gratitude and appreciation to the Immunobiological Sector of Quality Control Department, Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Sera and Enterprise for the Production of Bacterial Preparations of the Federal Medical and Biologic Agency of Russia, who participated in the standard approbation.

## Об авторах / Authors

Суханова Светлана Михайловна, канд. биол. наук / Svetlana M. Sukhanova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

Бердникова Зинаида Евтропиевна, канд. биол. наук / Zinaida E. Berdnikova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-4250>

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук / Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

Поступила 10.09.2025

После доработки 24.11.2025












Принята к публикации 12.12.2025

Received September 10, 2025

Revised November 24, 2025

Accepted December 12, 2025

## Специфическая активность и токсичность лиофилизированного препарата рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (*E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM): исследования *in vitro* и *in vivo*

С.Г. Гамалей<sup>✉</sup> , Г.Г. Шими́на , Е.А. Вязовая , О.В. Симакова , Т.Г. Ядренкина , О.С. Таранов , В.В. Омигов , К.Ф. Емцова , Т.И. Есина , Е.А. Волосникова , Е.Д. Даниленко 

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

✉ Гамалей Светлана Георгиевна; [gamaley\\_sg@vector.nsc.ru](mailto:gamaley_sg@vector.nsc.ru)

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Создание новых эффективных препаратов на основе гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) остается актуальной задачей, поскольку изучение биологических эффектов препарата открывает новые перспективы его клинического применения для лечения множества заболеваний — от онкологических и гематологических до нейродегенеративных. В связи с разработкой нового лиофилизированного препарата рекомбинантного человеческого ГМ-КСФ (рчГМ-КСФ) на основе штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21/pET-GST-6His-GM необходима оценка его специфической активности и токсичности.

**ЦЕЛЬ.** Изучение специфической пролиферативной (*in vitro*) и гемопозэстимулирующей (*in vivo*) активности, а также острой и субхронической токсичности нового лиофилизированного препарата рчГМ-КСФ для подкожного введения.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Использовали лиофилизированный рчГМ-КСФ (штамм *E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM) производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Россия). Пролиферативную активность определяли на культуре клеток эритролейкемии человека TF-1 в ХТТ-тесте. Гемопозэстимулирующую активность оценивали на мышах линии СВА/Calac (самцы, возраст 2,0–2,5 мес.) с моделью миелосупрессии, индуцированной циклофосфамидом (200 мг/кг, внутривенно). Препарат рчГМ-КСФ вводили животным подкожно в дозе 90 мкг/кг в течение 4 сут. На 5 сут анализировали лейкограмму. Острую токсичность препарата оценивали при однократном подкожном введении самцам и самкам мышей линии ICR (500 и 1000 мкг/кг), субхроническую — при четырехкратном введении (90 мкг/кг). Через 1 и 7 сут оценивали массу и температуру тела, общий и биохимический анализы крови, проводили макро- и микроскопические исследования внутренних органов, включая сердце, легкое, печень, почки и др.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Препарат рчГМ-КСФ проявлял выраженную пролиферативную активность на клетках TF-1 ( $ED_{50}=0,48$  нг/мл). На мышах с миелосупрессией препарат приводил к увеличению числа сегментоядерных нейтрофилов в 2,1 раза относительно контроля. Однократное и многократное введение препарата рчГМ-КСФ не вызывало гибель животных, не влияло на массу и температуру тела, а также не приводило к значимым изменениям гематологических, биохимических показателей, макро- и микроскопической структуры органов.

**ВЫВОДЫ.** Новый лиофилизированный препарат рчГМ-КСФ продемонстрировал высокую пролиферативную и гемопозэстимулирующую активность, а также отсутствие выраженной острой и субхронической токсичности. Полученные результаты обосновывают перспективность дальнейшей фармацевтической разработки данного препарата в качестве эффективного и безопасного гемопозэстимулирующего средства.

**Ключевые слова:** гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; рекомбинантные белки; рчГМ-КСФ; лиофилизированный препарат; пролиферативная активность; гемопозэ; острая токсичность; субхроническая токсичность; миелосупрессия; *in vitro*; *in vivo*

**Для цитирования:** Гамалей С.Г., Шими́на Г.Г., Вязовая Е.А., Симакова О.В., Ядренкина Т.Г., Таранов О.С., Омигов В.В., Емцова К.Ф., Есина Т.И., Волосникова Е.А., Даниленко Е.Д. Специфическая активность и токсичность лиофилизированного препарата рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (*E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM): исследования *in vitro* и *in vivo*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(1):108–118. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-108-118>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121040200101-8).

**Потенциальный конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Specific activity and toxicity of lyophilized recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (*E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM): *in vitro* and *in vivo* study

Svetlana G. Gamaley , Galina G. Shimina , Elena A. Vyazovaya ,  
Olga V. Simakova , Tatyana G. Yadrenkina , Oleg S. Taranov ,  
Vladimir V. Omigov , Ksenia F. Emtsova , Tatyana I. Esina ,  
Ekaterina A. Volosnikova , Elena D. Danilenko 

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region 630559, Russian Federation

✉ Svetlana G. Gamaley; [gamaley\\_sg@vector.nsc.ru](mailto:gamaley_sg@vector.nsc.ru)

### ABSTRACT

**INTRODUCTION.** The development of new effective drugs based on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) remains a relevant objective: the study of the drug's biological effects opens new prospects for its clinical use in the treatment of a wide range of diseases – from oncological and hematological disorders to neurodegenerative conditions. Developing a new lyophilized recombinant human GM-CSF (rhGM-CSF) based on *Escherichia coli* BL21/pET-GST-6His-GM producer strain warrants an assessment of its specific activity and toxicity.

**AIM.** This study aimed to examine the specific proliferative activity (*in vitro*) and hematopoietic stimulatory effect (*in vivo*), as well as acute and subchronic toxicity of a new lyophilized rhGM-CSF preparation for subcutaneous administration.

**MATERIALS AND METHODS.** Lyophilized rhGM-CSF (strain *E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM) produced by State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” (Russia) was used in the study. The proliferative activity was assessed in the human erythroleukemia TF-1 cell culture by XTT assay. Hematopoietic stimulatory activity was assessed in male CBA/Calac mice subjected to cyclophosphamide-induced myelosuppression (200 mg/kg, intraperitoneally). The rhGM-CSF preparation was administered at a dose of 90 µg/kg subcutaneously daily for 4 days. A leukogram was calculated on Day 5. The acute toxicity of the preparation was assessed by a single subcutaneous administration to male and female ICR mice at 500 and 1,000 µg/kg, subchronic toxicity – by four subcutaneous administrations at 90 µg/kg. On Days 1 and 7, body weight, temperature, complete blood count, biochemical markers and internal organ histology (heart, lungs, liver, kidneys, etc.) were evaluated.

**RESULTS.** The rhGM-CSF preparation demonstrated pronounced proliferative activity on TF-1 cells ( $ED_{50}=0.48$  ng/mL). In mice with myelosuppression, the preparation resulted in a 2.1-fold increase in the number of segmented neutrophils compared to the control group. Single and repeated administration did not cause death of animals, did not affect body weight or temperature, nor did it result in significant changes of hematological or biochemical parameters or macro- and microscopic anatomy of organs.

**CONCLUSIONS.** The new lyophilized rhGM-CSF preparation has demonstrated high proliferative and hematopoietic stimulatory activity, as well as insignificant acute and subchronic toxicity. The obtained results substantiate further pharmaceutical development of the preparation as an effective and safe hematopoietic stimulatory agent.

**Keywords:** granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; recombinant proteins; rhGM-CSF; lyophilized preparation; cell proliferation; hematopoiesis; acute toxicity; subchronic toxicity; myelosuppression; *in vitro*; *in vivo*

**For citation:** Gamaley S.G., Shimina G.G., Vyazovaya E.A., Simakova O.V., Yadrenkina T.G., Taranov O.S., Omigov V.V., Emtsova K.F., Esina T.I., Volosnikova E.A., Danilenko E.D. Specific activity and toxicity of lyophilized recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (*E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM): *in vitro* and *in vivo* study. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(1):108–118. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-108-118>

**Funding.** The study was funded under State Assignment of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rosпотребнадзор for applied scientific research (R&D Registry No. 121040200101-8).

**Disclosure.** The authors declare no conflict of interest.

## ВВЕДЕНИЕ

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) – гемопоэтический фактор роста, стимулирующий пролиферацию и активность гранулоцитов и макрофагов [1–4]. Это обусловило клиническое использование рекомбинантных аналогов ГМ-КСФ человека (рчГМ-КСФ) при заболеваниях, сопровождающихся миелосупрессией: при последствиях химио- и радиотерапии онкологических заболеваний, тяжелой хронической нейтропении, а также для мобилизации клеток периферической крови при трансплантации костного мозга [5–10]. Расширение знаний о биологических эффектах ГМ-КСФ открывает новые перспективы для его широкого клинического применения [2, 11].

Использование препаратов ГМ-КСФ сдерживается их высокой стоимостью и недостаточным присутствием на рынке, что обусловлено низкой продуктивностью штаммов-продуцентов. Ранее созданный в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора рекомбинантный штамм *Escherichia coli* SG20050/p280\_2GM, содержащий тандем генов ГМ-КСФ [12], и разработанная технология очистки позволили получить рекомбинантный белок с высокой чистотой и пролиферативной активностью [13]. Однако это не привело к полному решению проблемы продуктивности из-за нестабильности плазмиды. С использованием нового подхода, основанного на технологии слитых белков [14], была сконструирована плазида, обеспечивающая синтез белка,

который содержал, помимо последовательности ГМ-КСФ человека, белок глутатион-S-трансферазу (GST). Продуктом нового штамма *E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM являлся рекомбинантный белок, содержащий на N-конце остаток глицина, обладающий гемопоэзстимулирующей и пролиферативной активностью, сравнимой с эталонным препаратом (международный стандартный образец ГМ-КСФ ВОЗ) [15]. Выход белка достигал 8 мг из 1 г биомассы [15]. На основе этого белка была получена лекарственная форма – лиофилизат для подкожного введения. Однако для последующего применения препарата требуется его доклиническая оценка.

Цель работы – изучение специфической пролиферативной (*in vitro*) и гемопоэзстимулирующей (*in vivo*) активности, а также острой и субхронической токсичности нового лиофилизированного препарата рчГМ-КСФ для подкожного введения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

**Исследуемый препарат.** Использовали препарат рчГМ-КСФ в форме лиофилизата для подкожного введения на основе субстанции, полученной из штамма *E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM [15]. Состав лекарственной формы (на 1 мл раствора): 150 мкг рчГМ-КСФ (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора); 50 мг маннитола 5% (CAS № 69-65-8, ЕС № 200-711-8); 2,42 мг

трис(гидроксиметил)аминометан (CAS № 77-86-1, ЕС № 201-064-4); вода для инъекций («Гротекс», Россия, ЛП-002529) – до 1 мл.

**Культура клеток.** Для оценки специфической активности рчГМ-КСФ *in vitro* использовали клеточную линию TF-1 эритролейкемии костного мозга человека (Cell lines service GmbH, Германия)<sup>1</sup>. Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640 с глутамином (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия), содержащей 1% пенициллин-стрептомицин (Servicelbio, Китай), 10% эмбриональную телячью сыворотку (ООО НПП «ПанЭко», Россия), а также 3 нг/мл интерлейкина 3 (ИЛ-3) или 5 нг/мл рчГМ-КСФ. Условия культивирования: температура 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, влажность 85%. Для экспериментов использовали клетки 3–4 пассажа после разморозки из криохранилища при температуре жидкого азота.

**Экспериментальные животные.** Изучение гемопозэстимулирующей активности проводили на самцах мышей линии CBA/Calac (2,0–2,5 мес.) массой 19–24 г в соответствии с нормативными требованиями<sup>2</sup>. Для исследования токсичности использовали самцов самок аутбредных мышей линии ICR (возраст 2,0–2,5 мес., масса 18–21 г). Мыши были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирская область). Животные прошли адаптационный карантин и содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Содержание и манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Международной конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей<sup>3</sup>, а также Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях<sup>4</sup>. Протокол исследования был утвержден Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 2 от 14.02.2024).

## Методы

**Определение активности лиофилизированного препарата рчГМ-КСФ *in vitro*.** Пролиферативную активность рчГМ-КСФ определяли на клетках TF-1 микрометодом в 96-луночных планшетах (Biologix, Китай) с использованием 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетраз-

олий-5-карбоксамидида (ХТТ, CDH, Индия) и феназин-метасульфата (PMS, CDH, Индия) [16, 17] с модификацией. В качестве эталонного препарата использовали международный стандартный образец ГМ-КСФ ВОЗ – 1st standard for granulocyte macrophage colony stimulating factor (NIBSC code: 88/646)<sup>5</sup>. Суспензию клеток TF-1 в полной среде RPMI (50 мкл, 10<sup>4</sup> клеток/лунку) инкубировали с препаратами рчГМ-КСФ (диапазон концентраций 8–0,125 нг/мл, 50 мкл/лунку) в течение 72 ч при температуре 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 85%. По окончании инкубации в каждую лунку вносили 50 мкл реагента ХТТ/PMS и через 3 ч измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре Varioskan LUX (Thermo Scientific, Сингапур) при длинах волн 490/620 нм. Каждое разведение препарата рчГМ-КСФ (исследуемого и стандартного) анализировали в пяти повторях. Рассчитывали среднее значение оптической плотности и определяли уровень пролиферативной активности (индекс пролиферации) в процентах относительно контроля (без добавления ГМ-КСФ). На основании графика зависимости индекса пролиферации от концентрации рчГМ-КСФ определяли величину ED<sub>50</sub> – концентрацию препарата, обеспечивающую двукратное увеличение пролиферативного ответа. Расчеты выполняли с использованием Microsoft Excel.

**Определение гемопозэстимулирующей активности лиофилизированного препарата рчГМ-КСФ *in vivo*.** Исследование проводили на 18 мышах линии CBA/Calac с цитостатической миелосупрессией, которую моделировали однократным внутрибрюшинным введением циклофосфида (Sigma-Aldrich, США) в дозе 200 мг/кг по ранее описанному методу [18] с модификацией. Мышей рандомизировали с учетом массы тела на три группы. Через 24 ч после введения циклофосфида животным опытной группы подкожно в течение 4 сут вводили рчГМ-КСФ в дозе 90 мкг/кг (0,2 мл), которая ранее была определена как эффективная [18]; животным контрольной группы – физиологический раствор. Третья группа (интактный контроль) не получала препаратов. На 5 сут у всех животных отбирали кровь из хвостовой вены. В образцах определяли общее количество лейкоцитов, лейкограмму [19] и абсолютное количество сегментоядерных

<sup>1</sup> [https://sputnik-group.com/catalog/section\\_1398684/](https://sputnik-group.com/catalog/section_1398684/)

<sup>2</sup> Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012.

<sup>3</sup> European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg; 1986. <https://norecopa.no/media/2iydns5h/ets-123-original.pdf>

<sup>4</sup> [https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive\\_201063\\_rus.pdf](https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf)

<sup>5</sup> WHO International Standard. 1st standard for granulocyte macrophage colony stimulating factor (human, rDNA derived). NIBSC code: 88/646. <https://nibsc.org/documents/ifu/88-646.pdf>

нейтрофилов. Уровень гемопоэзстимулирующей активности рассчитывали как процентное отношение числа нейтрофилов крови опытных животных к контролю.

**Изучение токсичности лиофилизированного препарата рчГМ-КСФ при однократном и многократном введении.** Изучение токсичности препарата проводили в соответствии с общепринятыми подходами<sup>6</sup>. Для оценки острой токсичности мышей ICR рандомизировали по массе тела на три группы ( $n=20$ , 10 самцов и 10 самок). Мышам опытных групп 1 и 2 однократно подкожно вводили препарат рчГМ-КСФ в дозах 0,5 и 1 мг/кг, что превышало эффективную дозу в 5 и 11 раз соответственно. Животные контрольной группы получали эквивалентный объем физиологического раствора.

Для изучения субхронической токсичности мыши были разделены на 2 группы по 10 самцов и 10 самок в каждой. Животным опытной группы ежедневно в течение 4 сут подкожно вводили рчГМ-КСФ в эффективной дозе 90 мкг/кг (0,2 мл). Животные контрольной группы получали эквивалентный объем физиологического раствора по аналогичной схеме.

Через 1 сут после однократного или многократного введения проводили клиническое обследование животных (внешний вид, подвижность, поведенческие характеристики), а также физиологическое, гематологическое и биохимическое исследования. При физиологическом исследовании определяли температуру (термометр ТПЭМ-1, Россия) и массу тела (электронные весы SCOUT II SC 4010, OHAUS, США). Для гематологического и биохимического анализа у животных отбирали кровь из ретроорбитального синуса. В образцах крови с помощью автоматического гематологического анализатора MicroCC-20 Plus VET (США) определяли количество лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, содержание гемоглобина, показатели гематокрита и тромбокриты, а также проводили расчет лейкограммы [19]. Биохимические показатели определяли с помощью автоматического анализатора Miura 200 (I.S.E. S.r.l., Италия) с использованием коммерческих наборов (АО «Вектор-Бест», Россия).

Для патоморфологического исследования мышей выводили из эксперимента на 1 и 7 сут после однократного и окончания многократного введения препаратов методом дислокации шейных позвонков. Извлеченные внутренние

органы (сердце, легкое, печень, почки, надпочечники, селезенка, тимус, головной мозг, спинной мозг, регионарные лимфоузлы, желудок, тонкий и толстый кишечник, ткани из места введения, семенники/яичники) взвешивали на электронных весах GX-200 (AND, Япония) для расчета весовых индексов, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина («БиоВитрум», Россия) в течение 48 ч и подвергали стандартной гистологической обработке с заливкой в парафин<sup>7</sup>. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм готовили с помощью автоматического ротационного микротомы HM-360 (Германия), окрашивали гематоксилином и эозином, проводили микроскопию и микрофотосъемку (Axio Imager Z1, Zeiss, Германия) с использованием программы Axio Vision 4.8.2 (Zeiss, Германия).

**Статистическую обработку данных** проводили с использованием пакета программ Statgraphics, Vers 5.0 (Statistical Graphic Corp., США). Рассчитывали среднее арифметическое и ошибку среднего ( $M \pm m$ ). Для оценки межгрупповых различий применяли непараметрический  $H$ -критерий Краскела – Уоллиса; для попарных сравнений использовали  $U$ -критерий Манна – Уитни. Критический уровень значимости ( $p$ ) составлял 0,017 для трех попарных сравнений и 0,05 для двух [20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Пролиферативная активность препарата рчГМ-КСФ в культуре клеток TF-1**

Специфическую активность препарата *in vitro* оценивали стандартным методом по его способности стимулировать пролиферацию клеточной линии TF-1, чувствительной к ГМ-КСФ<sup>8</sup> [21]. Графики «доза – эффект» для лиофилизированного препарата рчГМ-КСФ и стандартного образца ГМ-КСФ оказались практически идентичными (рис. 1). Значения  $ED_{50}$  для рчГМ-КСФ и стандартного образца составили 0,48 и 0,61 нг/мл соответственно, что свидетельствует об их эквивалентной активности. Полученные данные согласуются с нашими предыдущими результатами ( $ED_{50}$  0,3–0,4 нг/мл) [13] и литературными данными (0,01–0,6 нг/мл) [22].

### **Гемопоэзстимулирующая активность препарата рчГМ-КСФ**

На модели цитостатической миелосупрессии, индуцированной циклофосфамидом (200 мг/кг), было показано выраженное угнетение

<sup>6</sup> Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: (иммунобиологические лекарственные препараты). М.: Гриф и К; 2012.

<sup>7</sup> Там же.

<sup>8</sup> 01/2008:1641 Molgramostim concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed.; 2023.

кровотворения: снижение уровня лейкоцитов и сегментоядерных нейтрофилов в 8 и 40,7 раза соответственно к 5 сут (данные не приведены). Четырехкратное применение рчГМ-КСФ у мышей в дозе 90 мкг/кг вызывало на 5 сут после введения циклофосамида статистически значимое повышение абсолютного количества сегментоядерных нейтрофилов в 2,1 раза по сравнению с контролем (рис. 2А). Общее число лейкоцитов также имело выраженную тенденцию к увеличению под влиянием рчГМ-КСФ (рис. 2В).

### Острая токсичность препарата рчГМ-КСФ

Однократное подкожное введение рчГМ-КСФ мышам линии ICR в дозах 0,5 и 1 мг/кг (в 5 и 11 раз выше эффективной) не вызывало гибели животных, изменений в их поведении, массе и температуре тела, а также не влияло на гематологические показатели по сравнению с контролем (табл. S1, S2, опубликованы на сайте журнала в Приложении 1<sup>9</sup>).

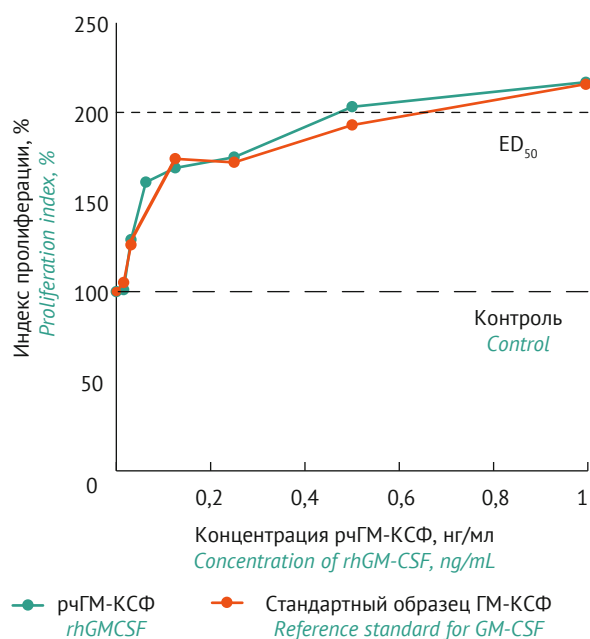


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

**Рис. 1.** График зависимости пролиферативной активности лиофилизированного препарата рчГМ-КСФ и стандартного образца ГМ-КСФ в культуре клеток TF-1 от концентрации препарата. ED<sub>50</sub> – концентрация препарата рчГМ-КСФ, обеспечивающая двукратное увеличение пролиферативного ответа. Контроль – физиологический раствор.

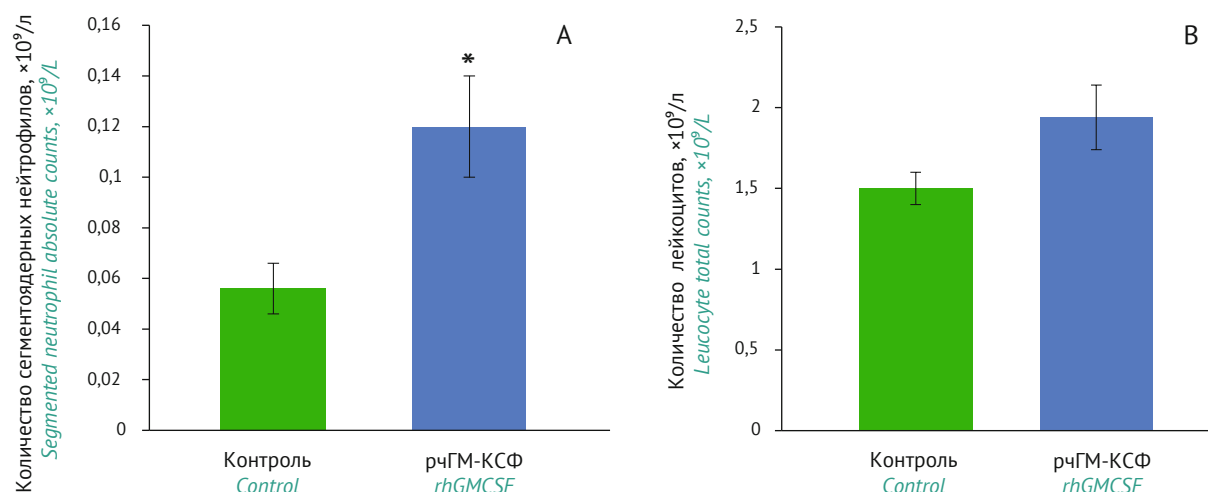
**Fig. 1.** Concentration-dependent proliferative activity of rhGM-CSF lyophilizate and reference standard for GM-CSF in TF-1 cell culture. ED<sub>50</sub>, drug concentration that provides a two-fold increase in the proliferative response. Control, saline.

Биохимический анализ крови мышей (табл. 1) не выявил существенного влияния рчГМ-КСФ на белковый (по уровню общего белка, альбумина, мочевины, активности аланинаминотрансферазы) и липидный обмен (по уровню холестерина и триглицеридов). Оценка углеводного обмена по содержанию глюкозы в крови показала, что в группе самок, получавших препарат в дозе 1 мг/кг, отмечалось умеренное повышение уровня глюкозы – на 27,8% через 1 сут после введения препарата, который нормализовался к 7 сут (табл. 1). Препарат не вызывал изменения активности амилазы крови самок и, следовательно, не оказывал токсического эффекта на структуру и функцию поджелудочной железы. У самцов существенных изменений этих показателей не выявлено. Полученные данные указывают на отсутствие токсического действия препарата на углеводный обмен.

Биохимические маркеры функции сердца (аспартатаминотрансфераза, креатинкиназа), печени (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза) и поджелудочной железы (амилаза) оставались в норме, что указывает на отсутствие токсического воздействия препарата на сердечно-сосудистую и пищеварительную системы (табл. 1). Единственным статистически значимым изменением было незначительное и преходящее повышение активности щелочной фосфатазы (примерно на 10%) через 1 сут после введения дозы 1 мг/кг, отмеченное у самцов и самок. Умеренное транзиторное повышение активности фермента не сопровождалось гистологическими нарушениями структуры печени и желчевыводящих путей у мышей опытной группы (табл. 1), характерными для лекарственного токсического повреждения гепатоцитов (печеночно-клеточный механизм) или нарушения оттока желчи (холестатический механизм) [23]. Согласно данным М.Г. Ипатовой с соавт. [23], повышение активности щелочной фосфатазы при холестазах коррелирует с ростом уровня холестерина и триглицеридов, чего в нашем исследовании не наблюдалось. Учитывая незначительную величину изменений, можно заключить, что они не связаны с токсическим воздействием препарата на печень.

Препарат рчГМ-КСФ не вызывал изменений уровня мочевины и электролитов (калий, кальций, хлориды) в крови животных (табл. 1), а также гистологической картины почек (рис. S1), что свидетельствует об отсутствии влияния на выделительную систему.

<sup>9</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-108-118-annex1>



Рисунки подготовлены авторами по собственным данным / The figures were prepared by the authors using their own data

**Рис. 2.** Влияние лиофилизированного препарата рГМ-КСФ на гематологические показатели крови мышей линии CBA/Calac с цитостатической миелосупрессией (5 сут после введения циклофосамида): А — абсолютное количество сегментоядерных нейтрофилов; В — общее количество лейкоцитов крови. \* — статистически значимое отличие по сравнению с группой контроля (физиологический раствор),  $p \leq 0,05$ .

**Fig. 2.** Effect of rhGM-CSF lyophilizate on hematological blood parameters in CBA/Calac mice with cytostatic myelosuppression (5 days following cyclophosphamide administration): A, absolute number of segmented neutrophils in peripheral blood; B, total number of blood leukocytes. \*, statistically significant difference compared to the control group (saline),  $p \leq 0.05$ .

Весовые индексы внутренних органов самок мышей опытных групп не отличались от контрольных значений (табл. S3, Приложение 1). У самцов через 1 сут после введения препарата наблюдалось снижение весового индекса тимуса на 16,9% ( $59,5 \pm 1,9$  против  $71,6 \pm 3,4$  мг/г) с сохранением этой тенденции к 7 сут. Для селезенки также выявлено снижение весового индекса через 7 сут — на 27% относительно контроля (табл. S3). Учитывая иммуномодулирующие свойства рГМ-КСФ, можно предположить, что эти изменения могут отражать перераспределение клеток в организме, связанное с миграцией клеток из органов иммунной системы. Однако гистологических признаков токсического воздействия рГМ-КСФ на органы и ткани, в том числе на органы иммунной системы, обнаружено не было (рис. S1).

#### Субхроническая токсичность препарата рГМ-КСФ

Четырехкратное подкожное введение рГМ-КСФ мышам линии ICR в эффективной дозе (90 мкг/кг) не приводило к гибели животных и появлению клинических признаков токсической реакции. Значимых изменений гематологических и биохимических показателей не выявлено, что свидетельствует об отсутствии токсического воздействия на систему крови, основные физиологические системы (сердечно-сосудистая, пищеварительная и выделительная) и обменные

процессы (табл. S4, S5, опубликованы на сайте журнала в Приложении 2<sup>10</sup>). Обнаруженное незначительное снижение уровня калия у самцов на 7 сут (на 12,4%) не позволяет говорить о нарушениях электролитного обмена (табл. S5). Макроскопическое и гистологическое исследование органов подтвердили отсутствие патологических изменений (рис. S2, Приложение 2).

Весовые индексы органов самцов мышей через 1 сут после окончания введения препарата рГМ-КСФ не отличались от контрольных показателей. У самок выявлено умеренное статистически значимое снижение весового индекса левой почки на 7 сут (на 13,3%), что, вероятно, связано с изменением тонуса сосудов органа. В этот же период в группе самок отмечена тенденция к незначительному (на 9–11%) снижению весовых индексов тимуса и селезенки (табл. 2).

Таким образом, лиофилизированный препарат рГМ-КСФ не проявлял токсического действия как при многократном введении мышам в эффективной дозе, так и при однократном введении в дозах, в 5–11 раз превышающих эффективную, что подтверждено отсутствием изменений в клиническом состоянии, поведении, физиологических функциях, обменных процессах, макро- и микроструктуре органов.

В настоящем исследовании продемонстрирована высокая специфическая активность препарата рГМ-КСФ в культуре клеток и на мышах,

<sup>10</sup> <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-108-118-annex2>

**Таблица 1.** Биохимические показатели крови самцов и самок мышей линии ICR после однократного подкожного введения лиофилизированного препарата рЧГМ-КСФ  
**Table 1.** Biochemical blood parameters in male and female ICR mice following a single subcutaneous administration of rhGM-CSF lyophilizate

Наименование показателя <i>Parameter</i>	Пол животных <i>Sex</i>	Группа животных <i>Group of animals</i>					
		Контроль <i>Control</i>	рЧГМ-КСФ, 0,5 мг/кг <i>rhGM-CSF, 0.5 mg/kg</i>	рЧГМ-КСФ, 1 мг/кг <i>rhGM-CSF, 1 mg/kg</i>	Контроль <i>Control</i>	рЧГМ-КСФ, 0,5 мг/кг <i>rhGM-CSF, 0.5 mg/kg</i>	рЧГМ-КСФ, 1 мг/кг <i>rhGM-CSF, 1 mg/kg</i>
		Через 1 сут после введения <i>1 day following administration</i>			Через 7 сут после введения <i>7 days following administration</i>		
Общий белок, г/л <i>Total protein, g/L</i>	♂	52,3±0,7	50,0±0,8	54,0±0,6	56,3±1,1	56,7±1,9	54,5±1,1
	♀	52,9±0,8	50,9±1,6	55,8±0,9	59,9±1,9	56,9±1,8	59,7±0,7
Альбумин, г/л <i>Albumin, g/L</i>	♂	27,8±0,4	26,9±0,5	28,8±0,5	27,5±0,3	27,9±0,8	28,4±1,0
	♀	29,3±0,6	28,8±1,4	31,0±0,4	30,6±1,1	29,9±0,9	30,0±0,6
Мочевина, ммоль/л <i>Urea, mmol/L</i>	♂	3,3±0,3	3,5±0,4	2,8±0,4	3,6±0,3	3,9±0,2	3,3±0,3
	♀	2,5±0,3	1,8±0,3	2,8±0,3	3,7±0,3	3,0±0,1	3,6±0,3
Глюкоза, ммоль/л <i>Glucose, mmol/L</i>	♂	10,4±0,5	9,7±0,5	10,9±0,4	9,9±0,3	10,5±0,4	9,8±0,6
	♀	9,0±0,2	9,7±1,5	11,5±0,1*	8,6±0,3	9,2±0,4	9,6±0,3
Общий холестерин, ммоль/л <i>Total cholesterol, mmol/L</i>	♂	3,2±0,1	2,9±0,1	3,5±0,1	4,3±0,1	4,4±0,1	4,1±0,1
	♀	2,9±0,2	3,1±0,3	3,8±0,2	3,7±0,3	3,0±0,2	3,6±0,3
Триглицериды, ммоль/л <i>Triglycerides, mmol/L</i>	♂	2,3±0,1	1,8±0,3	1,8±0,1	2,4±0,2	2,6±0,3	2,4±0,2
	♀	2,1±0,1	1,8±0,1	2,1±0,2	2,8±0,2	2,8±0,4	3,8±0,4
Аланинаминотрансфераза, Е/л <i>Alanine aminotransferase, U/L</i>	♂	35,8±3,4	33,6±6,1	35,1±2,4	35,6±2,0	45,5±1,7	39,3±2,3
	♀	26,9±1,5	31,9±2,7	31,4±1,3	40,2±3,0	37,7±2,3	39,2±0,9
Аспаратаминотрансфераза, Е/л <i>Aspartate aminotransferase, U/L</i>	♂	118,2±11,2	108,9±8,4	117,9±4,2	142,2±7,5	157,9±12,2	140,6±15,4
	♀	105,0±9,0	112,0±7,6	122,1±7,0	182,3±19,8	156,7±16,5	175,6±4,9
Щелочная фосфатаза, Е/л <i>Alkaline phosphatase, U/L</i>	♂	317,8±20,2	331,2±18,0	349,6±14,0*	338,6±23,2	328,0±26,2	336,0±21,3
	♀	316,0±16,1	330,8±22,4	347,8±14,2	346,6±32,4	334,2±25,6	334,2±8,5
Амилаза, Е/л <i>Amylase, U/L</i>	♂	696,7±17,9	713,1±50,3	802,1±29,8	1065,9±50,6	997,0±49,0	1012,0±70,2
	♀	830,5±62,5	731,2±51,1	818,8±37,3	1081,4±99,7	1156,4±89,4	1025,2±50,4
Креатинкиназа, Е/л <i>Creatine kinase, U/L</i>	♂	217,7±32,7	331,5±29,0	237,6±10,1	208,1±20,0	264,8±11,7	209,0±16,5
	♀	176,8±15,3	201,0±18,6	172,4±20,7	284,1±17,5	229,4±17,4	254,4±9,2
Калий, ммоль/л <i>Potassium, mmol/L</i>	♂	13,1±0,9	17,1±1,4	14,0±0,2	11,5±1,1	13,8±0,9	12,1±0,6
	♀	14,5±0,5	13,9±0,7	16,2±0,6	14,5±0,4	12,4±0,9	15,1±0,7
Кальций, ммоль/л <i>Calcium, mmol/L</i>	♂	2,5±0,2	2,7±0,3	2,2±0,0	2,7±0,1	2,4±0,2	2,3±0,1
	♀	2,4±0,2	2,0±0,0	2,5±0,3	2,5±0,1	2,4±0,1	2,5±0,1
Хлориды, ммоль/л <i>Chloride, mmol/L</i>	♂	112,0±0,7	111,1±1,1	113,9±0,8	107,2±1,3	105,4±1,4	108,8±1,2
	♀	115,6±1,2	116,4±1,8	117,7±0,6	112,3±0,4	110,6±1,5	115,0±1,0

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

Примечание. \* – статистически значимое отличие от группы контроля (физиологический раствор),  $p \leq 0,017$ . Количество животных в группе:  $n=10$ .

Note. \*, statistically significant difference compared to the control group (saline),  $p \leq 0,017$ . The number of animals in each group was  $n=10$ .

**Таблица 2.** Относительная масса внутренних органов самок мышей линии ICR после четырехкратного подкожного введения лиофилизированного препарата рчГМ-КСФ

**Table 2.** Relative organ weights in female ICR mice following four subcutaneous administrations of rhGM-CSF lyophilizate

Группа животных <i>Group of animals</i>	Масса животного, г <i>Body weight, g</i>	Весовые индексы органов, ×10 мг/г / <i>Organ weight indices, ×10 mg/g</i>						
		Сердце <i>Heart</i>	Легкое <i>Lung</i>	Печень <i>Liver</i>	Почка / <i>Kidney</i>		Селезенка <i>Spleen</i>	Тимус <i>Thymus</i>
					левая <i>left</i>	правая <i>right</i>		
<b>Через 1 сут после окончания введения / 1 day following administration</b>								
Контроль / <i>Control</i>	22,4±0,4	52,0±1,4	82,0±2,5	555,8±29,7	59,9±2,6	65,3±3,2	65,0±5,5	59,0±4,0
рчГМ-КСФ, 90 мкг/кг <i>rhGM-CSF, 90 µg/kg</i>	22,2±0,2	52,2±1,2	74,5±2,6	544,3±23,9	60,9±1,9	66,3±3,2	54,2±3,5	70,8±3,9
<b>Через 7 сут после окончания введения / 7 days following administration</b>								
Контроль / <i>Control</i>	26,7±0,6	48,4±2,4	72,1±3,5	563,6±18,8	65,3±1,1	65,9±1,9	71,0±6,2	60,5±3,1
рчГМ-КСФ, 90 мкг/кг <i>rhGM-CSF, 90 µg/kg</i>	26,8±0,6	48,6±3,6	74,7±1,8	558,8±20,2	56,6±2,2*	57,9±2,8	64,5±5,4	54,1±1,9

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

*Примечание.* \* – статистически значимое отличие по отношению к группе контроля (физиологический раствор),  $p < 0,05$ . Количество животных в группе:  $n=5$ .

*Note.* \*, statistically significant difference compared to the control group (saline),  $p < 0.05$ . The number of animals in each group was  $n=5$ .

а также показано отсутствие токсических свойств при однократном и многократном введении мышам. Полученные данные позволяют рекомендовать препарат рчГМ-КСФ для дальнейших доклинических исследований, включающих изучение общей токсичности на кроликах, иммунологической токсичности, алергизирующего действия и репродуктивной токсичности.

## ВЫВОДЫ

1. Препарат рчГМ-КСФ в форме лиофилизата для подкожного введения, полученный из штамма-продуцента *E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM, продемонстрировал высокую специфическую активность: пролиферативную активность *in vitro* на клетках TF-1 и гемопоэстимулирующую активность *in vivo* на мышах с цитостатической миелосупрессией.
2. Препарат не обладал выраженной острой и субхронической токсичностью на мышах (самцах и самках) при подкожном введении: однократное введение в дозах, в 5–11 раз превышающих эффективную, и многократное введение в эффективной дозе не вызывали гибели животных, клинических признаков интоксикации, снижения массы и температуры тела, а также значимых и стойких изменений гематологических, биохимических показателей, макро- и микроскопической структуры органов.
3. Высокая специфическая активность и благоприятный профиль безопасности обосновывают перспективность дальнейшей фармацевтической разработки лиофилизированного препарата рчГМ-КСФ в качестве гемостимулирующего средства.

## Литература/References

1. Зурочка АВ, Гриценко ВА, Зурочка ВА и др. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и его синтетические аналоги: иммунобиологические эффекты и клиническое применение. Екатеринбург: УрО РАН; 2021. Zurochka AV, Gritsenko VA, Zurochka VA, et al. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and its synthetic analogues: immunobiological effects and clinical application*. Ekaterinburg: UrO RAN; 2021 (In Russ.). EDN: LXCUQE
2. McCarthy J, Boyle N, McCarthy C. Recombinant GM-CSF drug evaluation review. *Immunotherapy*. 2025;17(14):983–93. <https://doi.org/10.1080/1750743X.2025.2571020>
3. Petrina M, Martin J, Basta S. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor has come of age: From a vaccine adjuvant to antiviral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2021;59:101–10. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.01.001>
4. Lazarus HM, Pitts K, Wang T, et al. Recombinant GM-CSF for diseases of GM-CSF insufficiency: Correcting dysfunctional mononuclear phagocyte disorders. *Front Immunol*. 2023;13:1069444. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1069444>
5. Dale DC, Crawford J, Klippel Z, et al. A systematic literature review of the efficacy, effectiveness, and safety of filgrastim. *Support Care Cancer*. 2018;26(1):7–20. <https://doi.org/10.1007/s00520-017-3854-x>
6. Rizzo A. Use of granulocyte colony-stimulating factor for adult cancer patients: current issues and future directions. *Future Oncol*. 2021;17(26):3411–5. <https://doi.org/10.2217/fon-2021-0678>
7. Mora J, Modak S, Kinsey J, et al. GM-CSF, G-CSF or no cytokine therapy with anti-GD2 immunotherapy for high-risk neuroblastoma. *Int J Cancer*. 2024;154(8):1340–64. <https://doi.org/10.1002/ijc.34815>

8. Obrador E, Salvador R, Villaescusa JI, et al. Radioprotection and radiomitigation: From the bench to clinical practice. *Biomedicines*. 2020;8(11):461. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8110461>
9. Lazarus HM, Ragsdale CE, Gale RP, Lyman GH. Sargramostim (rhu GM-CSF) as cancer therapy (systematic review) and an immunomodulator. A drug before its time? *Front Immunol*. 2021;12:706186. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.706186>
10. Ma M, Yao L, Li M, et al. Granulopoiesis-stimulating factors to prevent adverse effects in the treatment of solid tumors. *Cochrane Database Syst Rev*. 2024(1):CD015656. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD015656>
11. Зурочка АВ, Зурочка ВА, Добрынина МА, Гриценко ВА. Иммунобиологические свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и синтетических пептидов его активного центра. *Медицинская иммунология*. 2021;23(5):1031–54. Zurochka AV, Zurochka VA, Dobrynina MA, Gritsenko VA. Immunobiological properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and synthetic peptides of his active center. *Medical Immunology (Russia)*. 2021;23(5):1031–54 (In Russ.). <https://doi.org/10.15789/1563-0625-IPO-2216>
12. Гилева ИП, Есина ТИ, Волосникова ЕА и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК p280\_2GM, кодирующая полипептид со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, штамм *E.coli* SG 20050/p280\_2GM – продуцент полипептида со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека и способ получения указанного полипептида. Патент Российской Федерации № 2708556; 2019. Gileva IP, Esina TI, Volosnikova EA, et al. Recombinant plasmid DNA p280\_2GM coding polypeptide with properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of human, strain *Escherichia coli* SG 20050/p280\_2GM – producer of polypeptide with properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of human and method of obtaining of said polypeptide. Patent of the Russian Federation No. 2708556; 2019 (In Russ.). EDN: [GEBQSI](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00757)
13. Esina TI, Lebedev LR, Volosnikova EA, et al. Method for obtaining recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Biotechnology in Russia*. 2019;(3):68–73. EDN: [EBPUDB](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00757)
14. Qing R, Hao S, Smorodina E, et al. Protein design: From the aspect of water solubility and stability. *Chem Rev*. 2022;122(18):14085–179. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00757>
15. Волосникова ЕА, Волкова НВ, Гогина ЯС и др. Остаток глицина на N-конце рекомбинантного GM-CSF не снижает его гранулоцитопозстимулирующую активность. *Биотехнология*. 2025;41(1):69–77. Volosnikova EA, Volkova NV, Gogina YS, et al. Glycine Residue at the N-terminus of recombinant GM-CSF does not decrease granulocyteopoiesis stimulating activity. *Biotechnology in Russia*. 2025;41(1):69–77 (In Russ.). <https://doi.org/10.56304/S0234275825010120>
16. Kitamura T, Tange T, Terasawa T, et al. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol*. 1989;140(2):323–34. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041400219>
17. Гражданцева АА, Сиволюбова ГФ, Ткачева АВ и др. Высокоэффективная продукция биологически активного секретируемого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека рекомбинантным вирусом оспавакцины. *Биотехнология*. 2015;31(5):13–21. EDN: VLDZWR Grazhdantseva AA, Sivolobova GF, Tkacheva AV, et al. Highly effective production of biologically active, secreted, human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by recombinant vaccinia virus. *Appl Biochem Microbiol*. 2016;52(7):685–91. <https://doi.org/10.1134/S0003683816070036>
18. Шими́на ГГ, Батенева АВ, Гамалей СГ и др. Исследование гемостимулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020;20(4):268–76. Shimina GG, Bateneva AV, Gamaley SG, et al. Study on hemostimulating properties of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(4):268–76 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-268-276>
19. Новицкий ВВ, Евтушенко ОМ. *Руководство к практическим занятиям по гематологии*. Томск: Сибирский медицинский университет; 1999. Novitskiy VV, Evtushenko OM. *A guide to practical studies on hematology*. Tomsk: Siberian Medical University; 1999 (In Russ.). EDN: [SIFWVP](https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-268-276)
20. Гржибовский АМ, Иванов СВ, Горбатова МА. Сравнение количественных данных трех и более независимых выборок с использованием программного обеспечения STATISTICA и SPSS: параметрические и непараметрические критерии. *Наука и здравоохранение*. 2016;(4):5–37. Grijbovski AM, Ivanov SV, Gorbatova MA. Analysis of quantitative data in three or more independent groups using STATISTICA and SPSS software: parametric and non-parametric tests. *Science & Healthcare*. 2016;(4):5–37 (In Russ.). EDN: [WKPWYL](https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-268-276)
21. Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК и др. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(1):13–26. Alpatova NA, Gayderova LA, Yakovlev AK, et al. Assessment of biotechnological products specific activity. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(1):13–26 (In Russ.). EDN: [YHSSGL](https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-268-276)
22. Hercus TR, Bagley CJ, Cambareri B, et al. Specific human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(13):5838–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.5838>
23. Ипатов МГ, Мухина ЮГ, Шумилов ПВ. Интерпретация биохимического анализа крови при патологии печени. Синдром холестаза. Часть 2. *Практика педиатра*. 2017;(4):18–28. Ipatova MG, Mukhina YuG, Shumilov PV. Interpretation of biochemical blood test in liver pathology. Cholestasis syndrome. Part 2. *Pediatrician's Practice*. 2017;(4):18–28 (In Russ.). EDN: [ZMQPTH](https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-268-276)

**Дополнительная информация.** На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены *Приложения 1 и 2*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-108-118-annex1>  
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-108-118-annex2>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.Г. Гамалей** – анализ и систематизация данных научной литературы,

**Additional information.** *Supplements 1 and 2* are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-108-118-annex1>  
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-108-118-annex2>

**Authors' contributions.** All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **S.G. Gamaley** analyzed and systematized literature data, interpreted the

анализ и интерпретация результатов исследования, формулировка выводов, написание и редактирование текста рукописи; **Г.Г. Шими́на** – проведение исследований специфической активности *in vivo*, определение гематологических показателей при изучении острой и субхронической токсичности, статистическая обработка данных, оформление графического материала, написание текста рукописи; **Е.А. Вязова́я** – проведение экспериментальных исследований *in vitro*, сбор и анализ данных научной литературы; **Т.И. Есина, Е.А. Волосникова** – получение и анализ препаратов для исследования; **О.В. Симако́ва, Т.Г. Ядренки́на, О.С. Таранов, В.В. Омигов, К.Ф. Емцова** – проведение экспериментальных исследований острой и субхронической токсичности, статистическая обработка данных, подготовка и оформление таблиц; **Е.Д. Даниленко** – формирование цели и задач исследования; редактирование текста рукописи; утверждение окончательной версии статьи для публикации.

**Соответствие принципам этики.** Исследование проводилось в соответствии с национальными и международными руководствами по гуманному содержанию и использованию животных в научных исследованиях. Протокол-заявка утвержден Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол №2 от 14.02.2024).

research results, formulated the conclusions, drafted and edited the manuscript. **G.G. Shimina** conducted *in vivo* experimental studies of specific activity, detected hematological parameters in the study of acute and subchronic toxicity, processed statistical data, designed the graphs and participated in drafting the manuscript. **E.A. Vyazovaya** conducted *in vitro* experiments, collected and analyzed literature data. **T.I. Esina**, and **E.A. Volosnikova** obtained and tested drug dosage forms for the research. **O.V. Simakova, T.G. Yadrenkina, O.S. Taranov, V.V. Omigov**, and **K.F. Emtsova** conducted experimental studies of acute and subchronic toxicity, processed statistical data, prepared and designed the tables. **E.D. Danilenko** conceptualized the study, edited and approved the final version of the manuscript for publication.

**Ethics approval.** The study was conducted in full compliance with national and international guidelines for the humane care and use of animals in scientific research. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor (Meetings No.2 dated 02/14/2024).

## Об авторах / Authors

Гамалей Светлана Георгиевна / **Svetlana G. Gamaley**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7441-333X>

Шими́на Галина Григорьевна / **Galina G. Shimina**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1078-7033>

Вязова́я Елена Алексеевна, канд. биол. наук / **Elena A. Vyazovaya**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0394-9698>

Симако́ва Ольга Владимировна / **Olga V. Simakova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1222-7574>

Ядренки́на Татьяна Геннадьевна, канд. ветер. наук / **Tatyana G. Yadrenkina**, Cand. Sci. (Vet.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0644-9295>

Таранов Олег Святославович / **Oleg S. Taranov**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Омигов Владимир Вилорьевич, канд. мед. наук / **Vladimir V. Omigov**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2028-6099>

Емцова Ксения Федоровна / **Ksenia F. Emtsova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-5165-5357>

Есина Татьяна Игоревна / **Tatyana I. Esina**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9006-8313>

Волосникова Екатерина Александровна, канд. биол. наук / **Ekaterina A. Volosnikova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Даниленко Елена Дмитриевна, канд. биол. наук / **Elena D. Danilenko**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

Поступила 28.08.2025

После доработки 05.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Received August 28, 2025

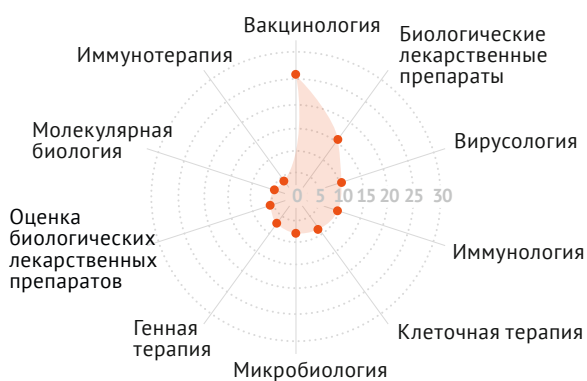
Revised February 5, 2026

Accepted March 13, 2026

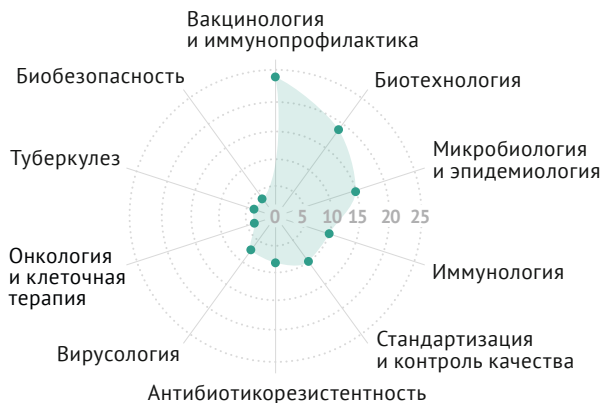
### Летопись достижений за 25 лет

Масштаб		Влияние		География	
📄 Выпусков	94	📖 Цитирований	2531	🌍 Стран	6
📄 Публикаций	902	📊 Пятилетний импакт-фактор РИНЦ	0,904	🏠 Городов	41
👤 Авторов	1067	📈 10-летний индекс Хирша журнала	16	🏛️ Организаций	104
👤 Рецензентов	297				

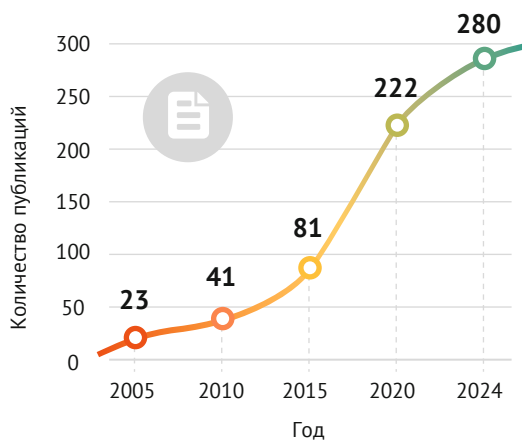
**Карта знаний:**  
тематический ландшафт публикаций (%)



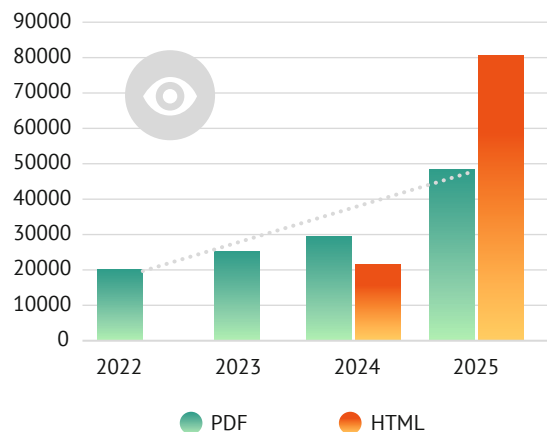
**Эхо цитирования:**  
распределение цитирующих публикаций по тематике (%)



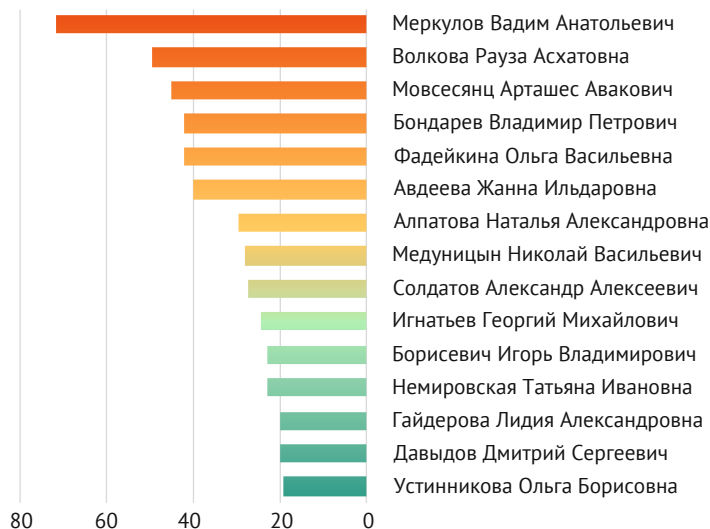
**Вектор роста:**  
увеличение годового числа цитирований



**Интерес читателей:**  
просмотры на сайте журнала



Архитекторы журнала:  
ТОП-15 авторов по публикациям



Классика жанра:  
самые цитируемые работы (ТОП-7)

- 1 **Супотницкий М.В.**  
112 Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий  
БИОпрепараты... 2011. № 2
- 2 **Горенков Д.В., Хантимирова Л.М., Шевцов В.А., Рукавишников А.В., Меркулов В.А., Олефир Ю.В.**  
103 Вспышка нового инфекционного заболевания COVID-19: β-коронавирусы как угроза глобальному  
здравоохранению  
БИОпрепараты... 2020. Т. 20. № 1
- 3 **Аксенова В.А., Леви Д.Т., Александрова Н.В., Кудлай Д.А.**  
57 Современное состояние вопроса заболеваемости детей туберкулезом, препараты для профилактики  
диагностики инфекции  
БИОпрепараты... 2017. Т. 17. № 3
- 4 **Юнаслова Т.Н., Горенков Д.В., Рукавишников А.В., Мовсесянц А.А., Меркулов В.А.**  
43 Анализ заболеваемости корью в России и проблемы профилактики кори на этапе элиминации  
БИОпрепараты... 2019. Т. 19. № 3
- 5 **Волкова Р.А., Фадейкина О.В., Климов В.И., Саканян Е.И., Олефир Ю.В., Меркулов В.А.,  
Мовсесянц А.А., Бондарев В.П., Борисевич И.В., Шведов Д.В.**  
34 Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных  
средств  
БИОпрепараты... 2016. Т. 16. № 4
- 6 **Онищенко Г.Г., Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.**  
32 Сравнительная характеристика вакцин против COVID-19, используемых при проведении массовой  
иммунизации  
БИОпрепараты... 2021. Т. 21. № 3
- 7 **Потеряев Д.А., Аббасова С.Г., Игнатъева П.Е., Стрижакова О.М., Колесник С.В., Хамитов Р.А.**  
29 Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против  
COVID-19 лиц с помощью Elispot набора Тигратест® SARS-CoV-2  
БИОпрепараты... 2021. Т. 21. № 3





ISSN 2221-996X



9 772221 996004