

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

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume

26

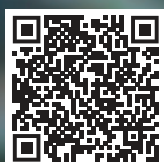
№ / No.

2

2026

ТЕМА НОМЕРА

Разработка препаратов для лечения редких (орфанных) заболеваний



www.biopreparations.ru



Уважаемые коллеги!

29 февраля — Международный день редких (орфанных) заболеваний. Високосная дата выбрана неслучайно (редкая дата — редкое заболевание). Как известно, слово «орфанный» произошло от английского «orphan» — беспризорный, сирота. Редкие болезни было очень сложно изучать, а фармакологические компании долгое время не были заинтересованы в разработке и выпуске лекарств для лечения пациентов с такими болезнями. Люди чувствовали себя брошенными, как сироты... В настоящее время ситуация кардинально изменилась, и обеспечение пациентов орфанными лекарственными препаратами рассматривается в качестве одного из важнейших направлений развития фармацевтической отрасли как в нашей стране, так и в мире.

В настоящее время рынок орфанных препаратов является одним из наиболее наукоемких и активно развивающихся сегментов мирового фармацевтического рынка. Устойчивый рост обусловлен регуляторными стимулами, прорывными достижениями в генной и клеточной терапии, а также неудовлетворенными медицинскими потребностями для лечения более чем 7000 редких заболеваний. В России за последние годы сформировался пул компаний, способных не только производить биоаналоги, но и разрабатывать собственные инновационные высокотехнологичные лекарственные препараты.

Законодательство развитых стран максимально старается мотивировать фармкомпании к разработке и производству орфанных препаратов, а поддержка государственного сектора стимулирует исследования и разработки портфеля продуктов, которые ранее считались коммерчески нежизнеспособными.

В связи с этим закономерен интерес журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» к реализации гибких подходов к разработке и оценке лекарственных препаратов для лечения редких заболеваний, решению проблем неопределенности доказательств их эффективности, обеспечению доступности орфанных препаратов для нуждающихся пациентов. Тема данного выпуска журнала охватывает вопросы эволюции терапии моногамных орфанных заболеваний в виде научно-исторического экскурса, ключевые аспекты доклинической разработки лекарственных препаратов для детской популяции на примере генотерапевтических лекарственных препаратов, современные подходы к получению клонов-продуцентов целевых белков для ферментозаместительной терапии.

Материалы тематического выпуска, несомненно, будут востребованы как медицинским сообществом, так специалистами фармацевтической отрасли.

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

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

ТОМ 26, № 2, 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.

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.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ (2025): 0,641.

CiteScore Scopus (2025): 0,7 (Q3).

Плата за публикацию статей и рецензирование рукописей не взимается.

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

VOLUME 26, NO. 2, 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”, level 2) 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 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.

Two-year RISC Impact Factor (2025): 0.641.

CiteScore Scopus (2025): 0.7 (Q3).

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: адено-ассоциированные вирусы, 3D-изображение (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX473575236/>)

Cover image: adeno-associated viruses, 3D illustration (a licensed image from the Photogenica image bank <https://photogenica.ru/zoom/PHX473575236/>)

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)

Мовсисянц 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. (Минск, Республика Беларусь)

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

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

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

Учредитель и издатель

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Шеф-редактор

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

**Ответственный редактор
тематического выпуска**

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

Научные редакторы

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

Редактор

Калиничев Сергей Анатольевич,
канд. фарм. наук

Редактор перевода

Малиновская Татьяна Петровна

Менеджер по развитию

Мжелский Александр Анатольевич

**Адрес учредителя, издателя
и редакции**

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

Исполнитель

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

Типография

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

Тираж

50 экз. Цена свободная

Подписано в печать

29.06.2026

Дата выхода в свет

12.07.2026

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 массо-
вых коммуникаций. Свидетельство
ПИ № ФС77-82918 от 14 марта 2022 г.

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

СОДЕРЖАНИЕ

Тема номера:

**РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РЕДКИХ
(ОРФАННЫХ) ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Д.А. Потеряев, Р.А. Хамитов

**Эволюция терапии моногенных орфанных
заболеваний и регуляторные аспекты разработки
орфанных препаратов 127**

А.М. Азарова, Н.А. Гаврилова, М.В. Тихомирова

**Доклиническая разработка педиатрических орфанных
генотерапевтических препаратов: анализ подходов
и проблем (обзор)..... 144**

Р.Л. Анисимов, Н.В. Никифорова, Е.С. Иванов, А.А. Овсепян,
А.А. Борзов, А.А. Казаров

**Активность CAG-промотора при gAAV-опосредованной
генной терапии: тканеспецифичность
и возрастная динамика..... 159**

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

**Получение клонов-продуцентов фермента кислой
альфа-глюкозидазы на основе клеток линии CHO-K1 171**

МЕХАНИЗМЫ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Е.В. Отрашевская, Т.Г. Самарцева, А.С. Оксанич, С.С. Гогина,
В.В. Зверев, Г.М. Игнатьев

**Применение метода детекции антителозависимого усиления
инфекции *in vitro* на примере вируса Чикунгунья 183**

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ

А.М. Елисейкин, И.В. Маргатский, В.Е. Артемов, А.В. Марущак,
И.С. Понкратенко, А.Н. Глушков, А.Е. Студенников

**Бифункциональные гибридные белки Z-mHoneydew
и Z-CyOFP1 на основе Z-домена белка A
Staphylococcus aureus для иммунофлуоресцентного
анализа иммуноглобулинов G в сыворотке крови..... 196**

СТАНДАРТИЗАЦИЯ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Е.И. Комаровская, К.А. Лыско

**Оценка полноты сорбции адсорбированных вакцин
для профилактики дифтерии и столбняка 208**

Л.В. Невская, Н.Э. Петрова, В.К. Капитанова, Л.А. Гайдерова,
О.В. Фадейкина

**Аттестация фармакопейного стандартного образца
лиофилизированной IgE-содержащей сыворотки
к аллергену пыльцы амброзии..... 220**

И.А. Алексеева, О.В. Шаповалова, Г.А. Сапожникова,
Н.П. Неугодова, Д.Н. Лепихова, И.В. Ибрагимхалилова

**Липоолигосахарид в цельноклеточных коклюшных
вакцинах: корреляция его содержания с параметрами
специфической безопасности у мышей..... 230**

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Editor-in-Chief

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

Deputy Editors-in-Chief

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

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

Executive Secretary

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

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

Editorial Board

Zhanna I. Avdeeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., 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.), Prof. (Minsk, 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

Guest Editor for the Special Issue

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof.

Science Editors

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

Editor

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

Translation Editor

Tatyana P. Malinovskaya

Development Manager

Alexander A. Mzhelsky

Postal address of the founder, publisher, and editorial office

8/2 Petrovsky Blvd., Moscow 127051
Tel.: +7 (499) 190-18-18
(63-42, 63-02, 63-35)
biopreparaty@expmed.ru

Contract publisher

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

Printing office

Triada Publishing House LLC:
9 Tchaikovsky Ave., office 514,
Tver 170034

Print run

50 copies. Free price

Passed for printing

June 29, 2026

Date of publication

July 12, 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 March 14, 2022

© Compilation, design. Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal
Products, 2026

CONTENTS

Issue topic

DEVELOPMENT OF MEDICINAL PRODUCTS FOR THE TREATMENT OF RARE (ORPHAN) DISEASES

D.A. Poteryaev, R.A. Khamitov
**Evolution of therapy monogenic orphan diseases and regulatory
aspects of orphan medicinal products development** 127

A.M. Azarova, N.A. Gavrilova, M.V. Tikhomirova
**Preclinical development of pediatric orphan gene therapy
medicinal products: Analysis of approaches
and challenges (review)** 144

R.L. Anisimov, N.V. Nikiforova, E.S. Ivanov, A.A. Ovsepyan,
A.A. Borzov, A.A. Kazarov
**Tissue specificity and age-related dynamics of CAG promoter
activity in rAAV-mediated gene therapy** 159

S.S. Timonova, S.S. Shubina, J.S. Snegireva, R.L. Anisimov,
N.V. Nikiforova, D.A. Tretyak, M.A. Koroleva, M.Yu. Neronova,
R.A. Khamitov
**Development of acid alpha-glucosidase-producing clones
based on the CHO-K1 cell line** 171

MECHANISMS OF IMMUNOPATHOLOGICAL PROCESSES

E.V. Otrashkevskaja, T.G. Samartseva, A.S. Oksanich, S.S. Gogina,
V.V. Zverev, G.M. Ignatyev
**Application of an *in vitro* method for detecting
antibody-dependent enhancement of Chikungunya virus
infection** 183

RECOMBINANT PROTEINS

A.M. Eliseikin, I.V. Margatskiy, V.E. Artemov, A.V. Marushchak,
I.S. Ponkratenko, A.N. Glushkov, A.E. Studennikov
**Bifunctional hybrid proteins Z-mHoneydew and Z-CyOFP1
based on the Z-domain of *Staphylococcus aureus* protein A
for immunofluorescence assay of immunoglobulins G
in blood serum** 196

STANDARDIZATION AND QUALITY CONTROL

E.I. Komarovskaya, K.A. Lysko
**Evaluation of the degree of adsorption of vaccine components
in diphtheria and tetanus vaccines adsorbed** 208

L.V. Nevskaya, N.E. Petrova, V.K. Kapitanova, L.A. Gaiderova,
O.V. Fadeikina
**Certification of a pharmacopoeial reference standard
of lyophilized IgE-containing serum to ragweed
pollen allergen** 220

I.A. Alekseeva, O.V. Shapovalova, G.A. Sapozhnikova,
N.P. Neugodova, D.N. Lepikhova, I.V. Ibragimkhalilova
**Lipooligosaccharide in whole-cell pertussis vaccines:
Correlation of its content with specific safety parameters
in mice** 230

Эволюция терапии моногенных орфанных заболеваний и регуляторные аспекты разработки орфанных препаратов

Д.А. Потеряев , Р.А. Хамитов 

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

✉ Потеряев Дмитрий Александрович; poteryaev@generium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В мире насчитывается от 6000 до 8000 описанных редких (орфанных) заболеваний (ОЗ), из которых около 80% имеют генетическую природу и часто являются жизнеугрожающими. Исторически разработка лекарственных средств (ЛС) для лечения ОЗ была затруднена из-за отсутствия экономических стимулов. За последние 10 лет в России наблюдается активный рост числа одобренных новых ЛС для ОЗ.

ЦЕЛЬ. Проследить историю подходов к лечению наиболее распространенных моногенных орфанных заболеваний и провести анализ проблемных аспектов разработки орфанных препаратов и внедрения их в медицинскую практику.

ОБСУЖДЕНИЕ. Исторические примеры ОЗ иллюстрируют как медленный прогресс терапии от симптоматической до патогенетической (муковисцидоз), так и взрывной рост патогенетических ЛС разных типов действующих субстанций и механизмов действия там, где до этого не было никакой эффективной терапии (спинальная мышечная атрофия). Показан путь от симптоматического лечения и первых заместительных подходов до современных патогенетических и этиотропных стратегий лечения ОЗ, включая рекомбинантные белки, малые молекулы (потенциаторы и корректоры), олигонуклеотидные препараты, ферментозаместительную терапию и генную терапию на основе аденоассоциированных вирусных векторов. Особое внимание уделено подходам по преодолению таких барьеров, как вирусная безопасность, доставка препаратов через гематоэнцефалический барьер («тройные кони»), и проблемам коммерциализации генной терапии. Рассмотрены современные регуляторные механизмы и меры поддержки разработки орфанных ЛС в России, странах ЕАЭС и мире. Предлагаются пути гармонизации регуляторных требований для повышения доступности терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Опыт последних десятилетий свидетельствует о трансформации подхода к ОЗ, которые перестали быть «безнадежными» и перешли в область наиболее интенсивного развития биомедицинских технологий. Дальнейший прогресс будет связан не только с созданием новых методов генной и клеточной терапии, но и с выстраиванием эффективных регуляторных, экономических и социальных механизмов, которые обеспечат равный доступ пациентов к терапии.

Ключевые слова: моногенные заболевания; редкие заболевания; орфанные заболевания; наследственные заболевания; ферментозаместительная терапия; генная терапия; аденоассоциированные вирусные векторы; гемофилия; лизосомальные болезни накопления; спинальная мышечная атрофия; регуляторные аспекты; клинические исследования

Для цитирования: Потеряев Д.А., Хамитов Р.А. Эволюция терапии моногенных орфанных заболеваний и регуляторные аспекты разработки орфанных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(2):127–143. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-127-143>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы являются сотрудниками компаний, занимающихся разработкой лекарственных средств для редких (орфанных) заболеваний. Однако при написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной и медицинской ценности обсуждаемых материалов и заявляют о беспристрастности оценки представленных данных. Р.А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2013 г.

© Д.А. Потеряев, Р.А. Хамитов, 2026

Издатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Evolution of therapy monogenic orphan diseases and regulatory aspects of orphan medicinal products development

Dmitry A. Poteryaev , Ravil A. Khamitov 

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

✉ Dmitry A. Poteryaev; poteryaev@generium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. There are between 6,000 and 8,000 described rare (orphan) diseases worldwide, about 80% of which are genetic in origin and often life-threatening. Historically, the development of medicinal products (MPs) for RDs was hampered by a lack of economic incentives. Over the past 10 years, Russia has seen an active increase in the number of approved new MPs for RDs.

AIM. To trace the history of approaches to the treatment of the most common monogenic orphan diseases and analyze the problematic aspects of the development and implementation of orphan drugs in medical practice.

DISCUSSION. Historical examples of rare diseases illustrate both the slow progress of therapy from symptomatic to pathogenetic (cystic fibrosis) and the explosive growth of pathogenetic MPs of various modalities where no effective therapy existed before (spinal muscular atrophy). The path from symptomatic treatment and early replacement approaches to modern pathogenetic and etiotropic strategies is shown, including recombinant proteins, small molecules (potentiators and correctors), oligonucleotide-based drugs, enzyme replacement therapy, and gene therapy based on adeno-associated viral vectors. Special attention is paid to overcoming barriers such as viral safety, drug delivery across the blood-brain barrier ("Trojan horses"), and the challenges of commercializing gene therapy. The review examines current regulatory mechanisms and support measures for the development of orphan MPs in Russia, the EAEU countries, and the world.

CONCLUSIONS. The experience of recent decades indicates a transformation in the approach to rare diseases which have ceased to be "hopeless" and have become an area of the most intensive development in biomedical technologies. Further progress will be linked not only to the creation of new gene and cell therapy methods but also to the establishment of effective regulatory, economic, and social mechanisms ensuring equal patient access to therapy.

Keywords:

monogenic diseases; rare diseases; orphan diseases; congenital diseases; enzyme replacement therapy; gene therapy; adeno-associated virus vectors; hemophilia; lysosomal storage diseases; spinal muscular atrophy; regulatory aspects; clinical studies

For citation:

Poteryaev D.A., Khamitov R.A. Evolution of therapy monogenic orphan diseases and regulatory aspects of orphan medicinal products development. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(2):127–143. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-127-143>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors are employees of the companies involved in the development of medicinal products for rare (orphan) diseases therapy. However, when writing the manuscript, the authors were guided by considerations of the scientific and medical value of the data discussed and declare the impartiality of the assessment of the data reviewed. R.A. Khamitov is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2013.

ВВЕДЕНИЕ

Редкими называются заболевания, имеющие распространенность не более 1 на 10 000 человек

населения¹. Это определение может варьироваться в разных странах. По данным различных национальных и международных реестров,

¹ Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

в мире зарегистрировано от 6000 до 8000 орфанных заболеваний (ОЗ)². По данным NORD (National Organization for Rare Disorders), 1 из 10 граждан США живет с редким заболеванием, половина из них — дети. В Российской Федерации существует Федеральный регистр лиц, страдающих жизнеугрожающими и хроническими прогрессирующими (орфанными) заболеваниями, которые приводят к сокращению жизни граждан или их инвалидности. Официальные перечни Минздрава России включают 297 ОЗ³ (данные на момент написания статьи) и 58 ОЗ, дорогостоящее лечение которых финансируется государством. В перечень включены относительно распространенные ОЗ, такие как гемофилия; муковисцидоз (МВ); мукополисахаридоз (МПС) I, II, VI; злокачественные образования лимфоидной, кроветворной и родственных тканей; гипопаратиреоидизм; рассеянный склероз; пароксизмальная ночная гемоглобинурия и др.⁴

По данным Orphanet⁵, ~80% ОЗ имеют генетическое происхождение, из них ~70% манифестируют в детском возрасте. Оставшиеся 20% являются онкологическими ОЗ, которые проявляются при воздействии факторов окружающей среды, например тератогенных, или имеют неизвестную этиологию. По данным NORD, ~80% ОЗ являются генетическими, хотя могут быть ассоциированы со спорадическими мутациями, как, например, клональная мутация стволовых клеток крови, вызывающая пароксизмальную ночную гемоглобинурию. Не все заболевания, имеющие генетическую природу, являются наследственными. Например, многие случаи МВ и спинальной мышечной атрофии (СМА) возникают *de novo* в гаметам родителей или на ранней стадии эмбриогенеза. Несмотря на малую встречаемость отдельно взятого ОЗ, суммарно редкие заболевания — это проблема для многих людей. В Российской Федерации ОЗ страдают от 1,5 до 2 млн человек, а в Европейском союзе (ЕС) ~30 млн⁶.

Для редких заболеваний введен термин «орфанные», что в свое время отражало факт отсутствия заинтересованности большинства фармацевтических компаний в разработке и производстве лекарственных средств (ЛС) для лечения ОЗ. Затем термин был закреплен в законе США (1983 г.)⁷. В настоящее время ситуация кардинально изменилась и обеспечение пациентов орфанными лекарственными препаратами (ЛП) рассматривается в качестве одного из важнейших направлений развития фармацевтической отрасли⁸. Процесс разработки ЛС для лечения ОЗ активно поддерживается регуляторными органами в большинстве развитых стран и имеет определенные преференции, сокращающие сроки вывода ЛС на рынок. При этом в случае создания эффективного ЛС происходит возврат инвестиций в разработку, несмотря на небольшую целевую популяцию пациентов. Эти меры поддержки имеют как общие, так и специфические особенности в разных регуляторных пространствах. На первый взгляд в Российской Федерации меньше инструментов, стимулирующих разработку орфанных ЛС, однако есть два достаточно уникальных механизма федерального уровня, гарантирующих обеспечение определенными орфанными ЛС каждого пациента с соответствующим диагнозом и находящегося в соответствующем реестре: программа «14 высокозатратных нозологий» и фонд «Круг добра», разделивших между собой зоны ответственности по лекарственному обеспечению ОЗ. Российская Федерация законодательно закрепила понятия «орфанные заболевания» и «орфанные препараты» в ФЗ-323⁹ и ФЗ-61¹⁰ соответственно.

Цель работы — проследить историю подходов к лечению наиболее распространенных моногенных¹¹ орфанных заболеваний и провести анализ проблемных аспектов разработки орфанных препаратов и внедрения их в медицинскую практику.

² <https://www.eurordis.org/>
<https://rarediseases.info.nih.gov/>
<https://www.orpha.net>

³ http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_decreasing_prevalence_orслучаи_RU.pdf
https://www.pharmcontrol.ru/news_main.php?id=137544&page=478

⁴ Постановление Правительства Российской Федерации от 26.04.2012 № 403 «О порядке ведения Федерального регистра лиц, страдающих жизнеугрожающими и хроническими прогрессирующими редкими (орфанными) заболеваниями, приводящими к сокращению продолжительности жизни граждан или их инвалидности, и его регионального сегмента».

⁵ http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_decreasing_prevalence_orслучаи_RU.pdf

⁶ <https://medgorod-clinic.ru/stati/redkie--orfannye--nasledstvennye-bolezni--osobennosti--statistika-i-perspektivy-lecheniya/#map1>

⁷ Orphan Drug Act (ODA) 21 CFR Part 316.

⁸ Перечень поручений по итогам совещания с членами Правительства от 6.11.2020 № Пр-1817.

⁹ Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

¹⁰ Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

¹¹ Моногенные заболевания — это наследственные патологии, вызванные мутацией (поломкой) в одном конкретном гене, наследуются по законам Менделя (аутосомно-доминантный, рецессивный или сцепленный с полом типы).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Эволюция терапии гемофилии

Эволюция терапии гемофилии — это одна из наиболее драматичных и необычных историй современной медицины, в течение которой неизбежно смертельное заболевание стало компенсированным состоянием с почти нормальной ожидаемой продолжительностью жизни. Далее по тексту и на *рисунке 1* перечислены основные вехи на этом пути [1–4].

Ранняя историческая эпоха и первые описания (античность — XIX век). Гемофилия была известна уже в древности. Талмуд (II век н.э.) освобождает от обрезания мальчиков матерей, чьи предыдущие сыновья умерли от кровопотери¹². В X веке арабский врач Альбукасис описал семьи, в которых поколения мальчиков умирали от кровотечения небольших ран. Термин «гемофилия» был введен немецкими врачами J.L. Schönlein и F. Hopff в 1820 г. Ранее в XIX веке было установлено, что болезнь наследуется по материнской линии, но страдают почти исключительно мальчики. Европейские монархии, в которых были потомки английской королевы Виктории, «популяризовали» гемофилию.

Эпоха переливания крови и плазмы. Первые попытки переливания крови больным гемофилией от здоровых доноров были сделаны в середине XIX в. До 40-х годов XX века специфического лечения не существовало. При кровотечениях пациентам с гемофилией прописывался покой и могла переливаться свежая донорская кровь. Данные процедуры имели ограниченную эффективность. В 30–40-е годы XX века было установлено, что некий фактор, присутствующий в определенной фракции плазмы крови здоровых людей, отсутствует у пациентов с гемофилией. Трансфузии свежей плазмы стали использоваться в качестве стандартной терапии, увеличивая продолжительность жизни пациентов.

Большой скачок. Концентраты факторов свертываемости (1960–1970 гг.). В 1960-х годах важнейшим достижением стала возможность делать криопреципитаты плазмы. Этот процесс был разработан J.E.G. Pool в 1965 г. Появление криопреципитата фактора VIII (FVIII) позволило вводить пациентам эффективный препарат в гораздо меньшем объеме, чем требовалось для достижения того же эффекта в случае трансфузии свежей плазмы. Такие препараты могли храниться в холодильниках и вводиться самими пациентами дома в профилактическом режиме. Впервые стала возможной как профилактика, так и незамедлительная терапия острых кровотечений.

Пациенты стали вести более независимый образ жизни, а ее качество повысилось.

Большая трагедия. Вирусная контаминация (1980–1990 гг.). Применение плазмы большого количества доноров привело к катастрофическим последствиям. Концентраты, в отсутствие эффективных процедур вирусной инактивации, переносили ВИЧ и вирус гепатита В и С. По разным оценкам, на мировом уровне 60–70% пациентов с гемофилией были инфицированы ВИЧ и почти 100% — гепатитом С, что имело опустошительные последствия для целого поколения пациентов и такие события инициировали принятие следующих экстренных мер:

1. Введение вирусной инактивации в процесс производства концентратов донорских факторов свертываемости методами сухого нагрева, пастеризации или применением детергентов.
2. Тотальный скрининг на ВИЧ и гепатит донорского материала и самих доноров с помощью новых высокочувствительных тестов.
3. Разработка рекомбинантных факторов свертываемости, когда стала очевидной необходимость создания полностью безопасных препаратов, которая требовала нового технологического прорыва.

Эпоха рекомбинантной ДНК (1990-е годы — настоящее время). В 1992 г. одобрен первый ЛП FVIII, произведенный по технологии рекомбинантной ДНК. Это было достигнуто путем клонирования человеческого гена FVIII и его гетерологичной экспрессии в культуре клеток яичников китайского хомячка, которые продуцируют данный фактор без риска контаминации человеческими патогенами. На этом развитие лечения гемофилии не остановилось. Для повышения эффективности лечения и удобства использования препаратов были разработаны:

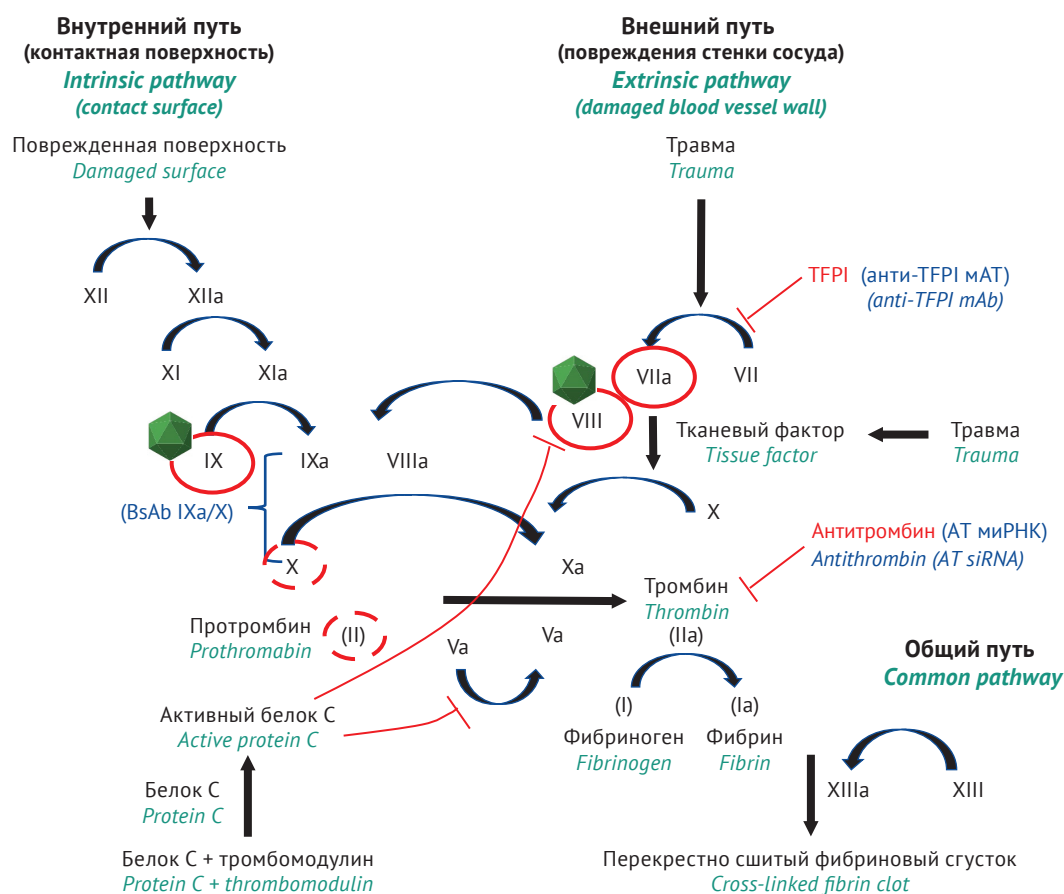
1. Рекомбинантные факторы свертываемости с увеличенным временем полувыведения, обеспечивающие как менее частое дозирование, так и более стабильный уровень фактора в крови между введением доз.
2. Препараты заместительной терапии, так называемые «шунтирующие», разработанные в первую очередь для ингибиторной формы гемофилии, когда использование FVIII или FIX неэффективно вследствие присутствия нейтрализующих антител к ним, например рекомбинантный FVII.
3. Применение биспецифического антитела эмицизумаба, имитирующего действие FVIII и вводимого один раз в неделю, революцио-

¹² Вавилонский Талмуд, Йевамот 64b.

низировало терапию как ингибиторной формы гемофилии, так и гемофилии без ингибиторов. Впоследствии разработаны другие терапевтические модальности, основанные на «ингибировании ингибиторов» и сдвигающие баланс про- и антикоагуляционных факторов в каскаде свертываемости крови (рис. 1): моноклональные антитела к TFPI (tissue factor pathway inhibitor) и миРНК, обеспечивающая нокдаун гена антитромбина (АТ).

Новый горизонт. При **генной терапии** (ГТ) используются вирусные векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), доставляющих

нормальные копии генов FIX или FVIII в клетки печени пациента. Цель ГТ — постоянная эндогенная продукция недостающих факторов свертываемости. Первые продукты для ГТ, например валоктокоген роксапаровек (Роктавиан), уже одобрены в США, Евросоюзе и некоторых других странах. Многолетняя мечта о функциональном излечении гемофилии близка к реальности, хотя остаются нерешенными некоторые вопросы безопасности ГТ [5]. В настоящее время наблюдается снижение интереса к разработке ГТ гемофилии у ряда ведущих мировых фармацевтических компаний. Компания Pfizer в 2025 г.



Изображение подготовлено авторами / The image was prepared by the authors

Рис. 1. Система свертывания крови и терапевтические воздействия при гемофилии: внутренний и внешний пути свертывания и их конвергенция при образовании сгустка. Римские цифры — факторы свертываемости; красные овалы (сплошная линия) — факторы свертываемости, рекомбинантные аналоги которых используются при гемофилии А и В, FVIII и FIX соответственно, или при ингибиторной форме гемофилии (FVII); красные овалы (пунктир) — факторы свертываемости, входящие в состав ЛП «антиингибиторный коагулянтный комплекс»; красные линии — действие антикоагуляционных белков; синий шрифт в круглых скобках — препараты шунтирующего действия, которые заменяют функцию FVIII (биспецифическое антитело к FIX и FX, BsAb) или ингибируют антикоагуляционные факторы (миРНК к антитромбину и моноклональные антитела к TFPI, tissue factor pathway inhibitor); зеленые икосаэдры — генозаместительная терапия FVIII и FIX.

Fig. 1. The blood coagulation system and therapeutic interventions in hemophilia. The intrinsic and extrinsic coagulation pathways and their convergence during clot formation are shown. Roman numerals, coagulation factors; red ovals (solid lines), coagulation factors whose recombinant analogs are used in hemophilia A and B (FVIII and FIX, respectively) or in the inhibitor form of hemophilia (FVII); dotted red ovals, coagulation factors (additional components of the "anti-inhibitor coagulant complex"); red lines, the action of anticoagulant proteins. Drugs with bypass action are highlighted in blue (parentheses): replacement of the function of FVIII (bisppecific antibody to FIX and FX, BsAb) or inhibition of anticoagulant factors (siRNA to antithrombin and monoclonal antibodies to TFPI (tissue factor pathway inhibitor protein)). Green icosahedra indicate gene replacement therapy (FVIII and FIX).

прекратила глобальную коммерциализацию ГТ гемофилии В (дефицит фактора IX) на основе препарата фиданактоген элапаровек (Beqvez), сославшись на низкий спрос на ГТ среди пациентов с гемофилией и врачей. Это объявление последовало за другими новостями о том, что Pfizer прекратила партнерство с Sangamo Therapeutics по ГТ гемофилии А (дефицит фактора XIII) на основе гироктогена фителпаровека в декабре 2024 г. Несмотря на положительные результаты, компания определила, что затраты на запуск и коммерциализацию препарата превысят доходы от ожидаемых продаж. Компания Biomarin (производит ГенЛП Роктавиан для лечения гемофилии А) и CSL Behring (производит этранакоген дезапаровек, Хемджиникс, для лечения гемофилии В) объявили, что темпы внедрения и продаж соответствующих препаратов оказались ниже ожидаемых.

Коммерческий провал программ ГТ с использованием AAV был также обусловлен тем, что многие пациенты, получавшие ГТ гемофилии А, в конечном итоге вернулись к профилактическому лечению по мере снижения экспрессии трансгенного фактора VIII с течением времени. Компания Pfizer не полностью отказалась от рынка лечения гемофилии. Вместо этого она переключила свое внимание на марстацитаб — антитело, получившее одобрение FDA для лечения гемофилии А и В, которое вводится подкожно один раз в неделю. Марстацитаб (анти-TFPI антитело) относится к шунтирующим препаратам (рис. 1). Внимания заслуживает препарат фитузиран (Sanofi) на основе малой интерферирующей РНК (миРНК), подавляющей экспрессию гена антитромбина (рис. 1). В настоящее время препарат находится на стадии регистрации для лечения гемофилии А и В. Фитузиран можно вводить с частотой один раз в два месяца, что значительно снижает нагрузку на пациентов по сравнению с факторами свертываемости и является более безопасным и переносимым препаратом по сравнению с процедурой введения ГенЛП на основе AAV¹³. Среди вероятных причин необходимости возврата пациентов на профилактическую терапию факторами свертываемости можно назвать потерю экспрессии трансгена из-за иммунного ответа или сайленсинг транскрипции. Это в большей степени относится к гемофилии А, вероятно, вследствие большего размера белковой молекулы и иммуногенности FVIII.

Таким образом, до 1960-х годов гемофилия представляла собой тяжелое, инвалидизирую-

щее и часто смертельное заболевание. В 1960–1980-е гг. появилось эффективное лечение, однако присущий ему риск вирусной контаминации повлек за собой трагедию в конце XX века. В 1980–2000-е гг. наблюдаются имплементация вирусной безопасности в процесс производства ЛП и появление рекомбинантных продуктов. С 2000-е годов по настоящее время — эра персонализированного подхода: факторы пролонгированного действия, инновационные терапии шунтирующего типа, появление генной терапии «одного введения». В США еще недавно продолжительность жизни больных гемофилией была на 10 лет меньше, чем в популяции в целом. В настоящее время продолжительность жизни пациентов с гемофилией в США всего на 1 год меньше, чем в общей популяции [2]. История терапии гемофилии — это путь от отчаяния к надежде, отмеченный совместными усилиями ученых, врачей, пациентов и фармацевтической индустрии, но также омраченный трагическими событиями, которые навсегда изменили меры обеспечения безопасности в биофармацевтической промышленности.

Эволюция терапии муковисцидоза

Муковисцидоз (МВ), или кистозный фиброз, — тяжелое наследственное системное заболевание, вызванное мутацией гена *CFTR*, при котором вырабатывается слишком густой секрет. Густая слизь закупоривает дыхательные пути и поджелудочную железу, вызывая хронические инфекции и проблемы с пищеварением. *CFTR* кодирует белок, функционирующий как ионный канал на поверхности эпителиальных клеток и обеспечивающий транспорт ионов хлора и воды, регулируя вязкость секрета в легких, поджелудочной железе и других органах. МВ проявляется кашлем с вязкой мокротой, частыми пневмониями, хроническими бактериальными и грибковыми инфекциями легких, нарушением пищеварения, задержкой развития. При МВ требуется пожизненная, комплексная терапия. МВ — наиболее распространенное жизнеугрожающее наследственное заболевание европеоидной расы, передающееся по рецессивному типу. На протяжении многих веков считалось, что МВ связан с колдовством и «сглазом», и лишь в 1938 г. D.H. Andersen охарактеризовала это заболевание и предположила его генетическое происхождение [6].

До середины XX века прогноз для пациентов с тяжелыми формами МВ был крайне неблагоприятным: большинство детей не доживало

¹³ Pfizer's bet on gene therapies in haemophilia has been a bust. <https://www.pharmaceutical-technology.com/analyst-comment/pfizers-bet-gene-therapies-haemophilia-bust/>

до пятилетнего возраста. Переломный момент наступил в 1950–1960-х гг., когда в клиническую практику вошли панкреатические ферменты, методы кинезитерапии (дренаж дыхательных путей) и антибиотики. Период с 1970-х по 1990-е гг. ознаменовался внедрением трансплантации легких и дорназы альфа (ДНКаза I), что способствовало дальнейшему увеличению медианы выживаемости до 31 года [7]. Наиболее впечатляющий прогресс наблюдался с конца XX века. С 1993 по 2017 г. в развитых странах отмечен резкий скачок медианной продолжительности жизни до 44 лет. Иными словами, половина пациентов с МВ, родившихся в США в период с 2013 по 2017 г., способны преодолеть данный возрастной рубеж. При этом географический фактор играет существенную роль. Согласно сравнительному анализу данных регистров США и Канады за 2017 г., который охватил 110 и 42 центра в США и Канаде соответственно, канадские пациенты в среднем живут на десятилетие дольше [8]. Исследователи связывают этот разрыв с различиями в доступе к трансплантации легких, качестве послеоперационного ведения и особенностями организации систем здравоохранения этих стран. Средний возраст пациента с МВ в Европе, Израиле и Российской Федерации составляет приблизительно 22,3 года. Усредненное значение продолжительности жизни при МВ в г. Москве составляет 37 лет, а в целом по России – 20 лет [9].

Начало XXI века ознаменовало новую эру терапии МВ – появление этиотропной терапии. Структурно-функциональные исследования ионного канала CFTR привели к созданию нового класса препаратов – малых молекул, восстанавливающих утраченную функцию CFTR у пациентов с наиболее распространенными мутациями CFTR. Малые молекулы служат как потенциаторы (ивакафтор), которые облегчают открытие и проводимость ионного канала CFTR, либо как корректоры (лумакафтор, тезакафтор), облегчающие правильное сворачивание белка CFTR и его доставку на поверхность клетки, увеличивая количество каналов на поверхности. Потенциаторы и корректоры применяются в комбинации для усиления этих функций и увеличения количества ионных каналов [10].

Терапия МВ прошла один из самых долгих и трудных путей развития в истории медицины, основные вехи которого представлены на рисунке 2 [11–13] и временной шкале (онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала¹⁴).

Попытки создания ГТ МВ начали свою историю с 1993 г., когда был осуществлен перенос нормальной копии гена *CFTR* с помощью AAV в дыхательный эпителий пациентов. С тех пор разработка ГТ МВ идет с применением как вирусных векторов (аденоассоциированные, ленти- и ретровирусы), так и не вирусных средств доставки, основанных на комплексах катионных липидов с ДНК. Практически все эти попытки потерпели неудачу в клинических испытаниях, что связывают с низкой эффективностью трансдукции, иммунным ответом на препарат, нестабильной экспрессией трансгена. Тем не менее заслуживают внимания последние разработки в этой области. Например, компания Abeona Therapeutics, используя модифицированный капсид AAV, добилась повышения трансдукции дыхательного эпителия в 3–5 раз по сравнению с более традиционными капсидами, такими как AAV6, что дает основание к переходу этой разработки в клиническую стадию [14, 15]. На этапе доклинических исследований находятся два других подхода: невирусная доставка мРНК *CFTR* в легочный эпителий с помощью липидных наночастиц и редактирование мутантного гена *CFTR* в легочном эпителии *in vivo* с помощью нуклеаз CRISPR/Cas9. Например, компания Arcturus использовала первый подход и продемонстрировала, что упакованная в липидные наночастицы мРНК *CFTR*, ингаляционно доставленная в легкие хорька с МВ, эффективно очищает и восстанавливает функции дыхательного эпителия *in vivo*. [16]. Пример второго подхода – разработка системы редактирования отдельных пуриновых/пиримидиновых оснований (base editing), описанная итальянским университетским коллективом [17]. В стратифицированной культуре эпителиальных клеток от пациентов с МВ была показана функциональная реверсия мутации F508del гена *CFTR* с помощью CRISPR base editing.

Эволюция терапии спинальной мышечной атрофии (СМА)

СМА – тяжелое наследственное заболевание нервно-мышечной системы, вызванное мутацией в гене *SMN1*, приводящее к гибели моторных нейронов спинного мозга. Болезнь проявляется прогрессирующей мышечной слабостью и атрофией, которые приводят к нарушению движений, дыхания и глотания, и является одной из основных генетических причин смертности в младенческом и детском возрасте. История лечения СМА – яркий путь современной медицины, ведь в отличие от МВ, никакой действенной терапии

¹⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-127-143-annex>

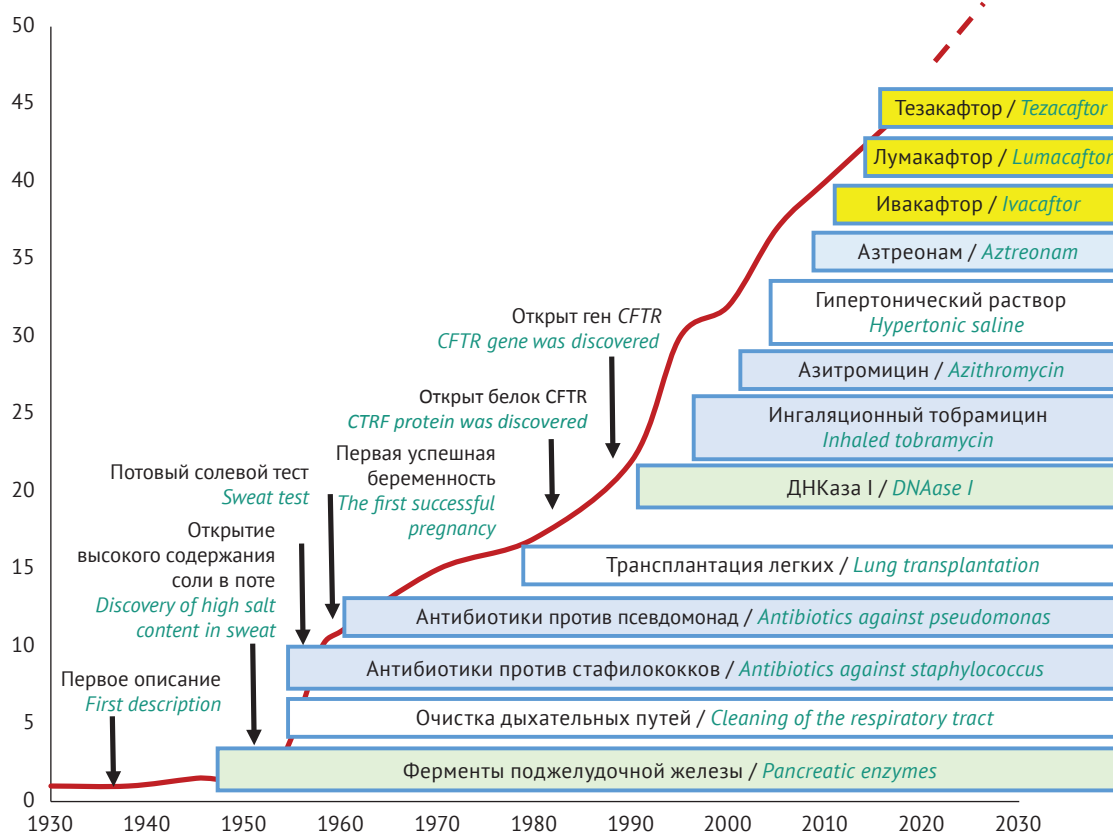


Рисунок составлен авторами по данным источника <https://www.continued.com/respiratory-therapy/articles/cystic-fibrosis-a-comprehensive-overview-112> с изменениями / The image was adapted from <https://www.continued.com/respiratory-therapy/articles/cystic-fibrosis-a-comprehensive-overview-112> with modifications

Рис. 2. Исторические вехи и прогресс терапии муковисцидоза. Ось X — временная шкала (годы); ось Y — средняя продолжительность жизни пациентов с муковисцидозом. Зеленые прямоугольники — белковые терапевтические препараты; синие — антибиотики; желтые — препараты таргетной терапии, восстанавливающие функцию мутантного ионного канала CFTR. В 2017 г. средняя ожидаемая продолжительность жизни составила ~44 года, ~53% пациентов ≥18 лет.

Fig. 2. Historical milestones and progress in cystic fibrosis therapy. X-axis, timeline (years); Y-axis, average life expectancy of patients with cystic fibrosis. Green rectangles, protein therapeutic drugs; blue rectangles, antibiotics; yellow rectangles, targeted therapy drugs that restore the function of the mutant CFTR ion channel. In 2017, the average life expectancy was ~44 years, and ~53% of patients were ≥18 years old.

не было доступно еще 10 лет назад. За короткий срок был пройден путь от полного отсутствия терапевтических опций до появления целого набора инновационных и эффективных ЛС.

Хронологическое развитие терапии СМА представлено ниже.

Фаза 1. Понимание болезни и терапевтическая безнадежность (до 1995 г.). История СМА от первого описания до появления первой эффективной этиотропной терапии насчитывает немногим более века [18]. Клиническое описание СМА было сделано G. Werdnig и J. Hoffmann в конце XIX века. На протяжении более 100 лет использовались только поддерживающие меры, такие как специальное питание, физиотерапия, искусственная вентиляция легких (ИВЛ). Причина заболевания, тем более генетическая, оставалась неизвестна, что затрудняло разработку действенных терапевтических средств.

Фаза 2. Открытие генетической основы (1995 г.). Ключевым этапом стали усилия международного консорциума по идентификации гена *SMN1* (Survival Motor Neuron 1) на хромосоме 5q [19]. Причину заболевания связывали с делециями или миссенс мутациями в *SMN1*. Тяжесть заболевания парадоксальным образом зависит от количества копий гена *SMN2*, почти идентичного *SMN1*. Ген *SMN2* в основном кодирует усеченный с С-конца белок SMN, который в остальном идентичен SMN, произведенному нормальным геном *SMN1*, при этом усеченный SMN также нестабилен. Причиной дефектного белка SMN является альтернативный сплайсинг гена *SMN2*, который приводит к исключению экзона 7 из зрелой мРНК. Тем не менее *SMN2* все же производит небольшое количество полноразмерного белка SMN. Эти находки позволили сделать *SMN2* главной терапевтической

мишенью с целью поиска модификатора сплайсинга *SMN2* для производства большего количества функционального белка SMN [18].

Фаза 3. Первое поколение терапии, модифицирующей течение болезни (2011–2016 гг.). В этот период произошло развитие различных стратегий, направленных на повышение уровня белка SMN. Известна терапия антисмысловыми олигонуклеотидами (АСО), например нусинерсеном (Спинраза, Лантесенс). Исследования проводились под руководством A.R. Krainer (Cold Spring Harbor Laboratory), а разработкой препарата занялись компании Ionis и Biogen¹⁵. Механизм действия разработанного препарата был основан на том, что специфический АСО присоединялся к пре-мРНК *SMN2*, корректируя сплайсинг для включения экзона 7 в зрелую мРНК, что приводило к синтезу полноразмерного белка SMN. Клиническая апробация терапии проводилась в исследовании ENDEAR, в котором продемонстрированы положительные эффекты у младенцев [20]. Препарат, который вводится интратекально с частотой 1 раз в 4 мес., получил одобрение FDA в декабре 2016 г.

Генетическая заместительная терапия с использованием онасемноген абепарововека (Золгенсма). Исследования академических лабораторий и компании AveXis (впоследствии Novartis) привели к созданию вирусного вектора на основе AAV9, который доставляет копию нормального *SMN1* в мотонейроны после однократной внутривенной инфузии препарата. Данный препарат для ГТ зарегистрирован в мае 2019 г. ЛП назначается пациентам до 2 лет однократно, поскольку продемонстрированы лучшие результаты по предотвращению развития заболевания при его введении на пресимптоматической стадии [21]. В конце 2025 г. в США был зарегистрирован ЛП Itvisma, вводимый интратекально и не имеющий максимального ограничения по возрасту¹⁶.

Фаза 4. Расширение арсенала терапевтических опций. Появление пероральной формы терапии рисдипламом (Эврисди). Разработка компаний Roche/Genentech и PTC Therapeutics привела к созданию препарата на основе малой молекулы с пероральной биодоступностью. Рисдиплам (производное пиридазина) модифицирует сплайсинг гена *SMN2*, увеличивая продукцию функционального SMN системно, включая ЦНС. Препарат зарегистрирован в августе

2020 г., и его применение дает возможность неинвазивной патогенетической терапии, избегая рисков жизнеугрожающей аутоиммунной реакции на заместительную ГТ. Необходимо отметить, что при прочих равных условиях (возраст пациента, прогрессия заболевания, характер мутации, количество копий *SMN2*) пероральный препарат рисдиплам по крайней мере не уступает по эффективности инъекционному препарату нусинерсен, а по некоторым данным может даже превосходить его [22].

Современность и будущее. Потенциальная терапевтическая выгода комбинаторной терапии вышеописанными препаратами пока мало реальна из-за высокой стоимости каждого из них. Нейропротекция мотонейронов, регенерация их аксонов, стимуляция мускулатуры могут дополнить эффект терапии, направленной на *SMN*. Перспективной является технология редактирования генома *in vivo* с помощью CRISPR/Cas9, которая может привести либо к перманентной коррекции дефектного гена *SMN1* в мотонейронах, либо к такой же перманентной активации экспрессии функционального SMN геном *SMN2*. Успех терапии, примененной на пресимптоматической стадии, способствовал переходу медицинского сообщества и биотехнологических компаний к незамедлительному введению всеобщего неонатального скрининга СМА [18].

Последствия и нерешенные проблемы. СМА перестала быть неизлечимой болезнью и теперь имеет несколько терапевтических опций, которые могут не просто остановить прогрессию заболевания, но и, при применении внутри определенного терапевтического окна, могут даже предотвратить появление симптомов. Эффективность разработанных ЛС достигла впечатляющих результатов. У детей, которым более не грозит переход на пожизненную ИВЛ, продолжительность жизни существенно увеличилась и сохраняются моторные навыки, такие как сидение или ходьба. Однако остаются проблемы доступности и стоимости терапии. Высокая стоимость разработанных ЛС для терапии СМА делает их доступность зависящей исключительно от развитости системы здравоохранения конкретной страны, что выражается в неравенстве на глобальном уровне. Стоимость однократной генной терапии СМА (Золгенсма) в Германии составляет 1 945 000 евро¹⁷. Стоимость первого

¹⁵ <https://www.cshl.edu/candidate-drug-for-spinal-muscular-atrophy-with-roots-in-cshl-research-passes-major-hurdle/>

¹⁶ Novartis receives FDA approval for Itvisma, the only gene replacement therapy for children two years and older, teens, and adults with spinal muscular atrophy (SMA). <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-receives-fda-approval-itvisma-only-gene-replacement-therapy-children-two-years-and-older-teens-and-adults-spinal-muscular-atrophy-sma>

¹⁷ Germany first in EU to get Novartis' SMA gene therapy, costing almost 2m euros. <https://pharmaphorum.com/news/novartis-eyes-smart-deal-for-sma-gene-therapy-in-uk>

и последующего года терапии СМА препаратом Спинраза в Канаде составляет 1 062 000 канадских долларов, а 25-летней терапии — 9 204 000¹⁸. Нерешенной остается проблема лечения взрослых пациентов: эффективность текущих ЛС существенно снижается с более поздним сроком начала терапии, хотя все еще есть положительные эффекты, оправдывающие ее применение. Таким образом, СМА является показательным примером того, как фундаментальные генетические исследования, за которыми следует применение инновационных технологических платформ (ASO, генная терапия, модификаторы сплайсинга), могут решить медицинскую проблему за очень короткое время.

Эволюция лизосомных болезней накопления (ЛБН)

ЛБН представляет собой группу из 50–60 различных метаболических расстройств, характеризующихся аномальным, прогрессирующим накоплением нерасщепленных веществ в пораженных клетках, что может привести к тяжелой инвалидности и во многих случаях к летальному исходу. Считается, что общая распространенность ЛБН составляет 1 случай на каждые 2000–5000 новорожденных [23]. В 1964 г. Christian de Duve впервые предположил, что ферментная заместительная терапия (ФЗТ) может оказаться эффективной при ЛБН. Он сформулировал это следующим образом: «В наших патогенетических рассуждениях и терапевтических попытках следует помнить, что любое вещество, поглощенное внутриклеточно в процессе эндоцитоза, скорее всего, окажется в лизосомах» [24]. ФЗТ получила распространение в клинической практике и является эффективной стратегией в отношении 12 из 50–60 известных ЛБН [25], но имеет ряд недостатков, включая различные побочные эффекты, развитие «резистентности» и неоптимальную доставку препарата по всему организму (особенно в ЦНС), что снижает терапевтический эффект и исключает использование этого подхода для многих ЛБН. Кроме ФЗТ, для лечения ЛБН применяются или исследуются и другие подходы, приведенные в *таблице S1* (онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала¹⁹). За исключением терапии снижением ферментного субстрата (миглустат, элиглустат), нашедшей свое место в терапии болезни Гоше тип I и Нимана-Пика тип C, остальные подходы (трансплантация органов или гемопоэтических

стволовых клеток) пока являются экспериментальными или ограниченно применяемыми. Описание одобренных и экспериментальных видов терапии ЛБН [25–33] приведено в *таблице S1* (онлайн-приложение).

Преодоление барьера ферментозаместительной терапии ЛБН

Группа ЛБН оказалась сравнительно успешным полем для применения ФЗТ в качестве патогенетической терапии, использующей рецепторопосредованный эндоцитоз (receptor-mediated endocytosis, RME) для доставки ферментов в лизосомы. Для лизосомального таргетинга ферментов используются маннозные или манноз-6-фосфатные рецепторы клетки (MPR, M6PR), а сами доставляемые ферменты должны содержать гликаны МР или М6Р. Как правило, это достигается гликоинжинирингом на стадии очистки рекомбинантного белка из культуральной жидкости продуцента, примером чего является рекомбинантная модифицированная бета-глюкоцереброзидаза для терапии болезни Гоше [25]. В отдельных случаях рекомбинантный лизосомальный фермент уже на стадии секреции из клетки-продуцента имеет необходимые для RME гликаны вследствие особенностей аппарата гликозилирования продуцента (идурсульфаз для терапии МПС II)²⁰. Для достижения целевого профиля гликозилирования рекомбинантной лизосомной кислотной липазы (LAL), являющейся активной фармацевтической субстанцией препарата себелипаза, показанного для ФЗТ дефицита LAL, был применен такой радикальный подход, как замена традиционных клеточных линий-продуцентов (CHO, Sp2/0, BHK, NSO и др.) на экспрессию в трансгенном животном. В данном случае рекомбинантный белок секретируется в белок яиц трансгенных кур и выделяется оттуда для получения очищенной активной фармацевтической субстанции, которая характеризуется высоким содержанием М6Р, критически важным для интернализации фермента целевыми клетками. Фосфорилирование маннозных остатков происходит в овидукте курицы при созревании яйца [35].

ЛБН по-разному поражают ткани и органы пациентов. Например, болезнь Гоше — наследственное ЛБН, вызванное дефицитом глюкоцереброзидазы, классифицируется на 3 основных типа в зависимости от наличия и тяжести неврологических симптомов. Тип I — без поражения ЦНС — самый распространенный (90%); типы

¹⁸ <https://www.cda-amc.ca/sites/default/files/DRR/2022/SR0713-Spinraza-Reassessment.pdf>

¹⁹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-127-143-annex>

II и III — нейронопатические с тяжелыми неврологическими нарушениями. При синдроме Хантера (МПС тип II), тяжелая форма (МПС IIA) характеризуется быстрым прогрессированием, выраженными нарушениями со стороны нервной системы, включая тяжелую умственную отсталость, поражением внутренних органов (сердце, легкие, печень) и скелетными деформациями. В то же время при среднетяжелой или легкой форме (МПС IIB) клинические признаки появляются позже, а умственные способности обычно сохранены. Классическая ФЗТ на основе RME, в которой используются гликаны рекомбинантных белков для таргетинга, хорошо справляется с дефицитом лизосомальных ферментов при ЛБН во всех тканях, кроме ЦНС, из-за наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), блокирующего попадание фермента после внутривенного введения [35].

Если препарат рекомбинантной глюкоцереброзидазы, вводимой внутривенно, является эффективной терапией болезни Гоше типа I, то препарат рекомбинантной идурсульфазы, применяемый для лечения синдрома Хантера, способствует нормализации тканей только за пределами ЦНС. Замедление умственного развития у пациентов наступает в возрасте 2–4 лет с последующим регрессом многих приобретенных навыков. Несмотря на непроницаемость ГЭБ для крупных молекул, существуют белки, которые в силу своей функции доставляются через ГЭБ в мозг «специальным транспортом». Такими белками являются рецептор трансферрина и инсулиновый рецептор. Их отличительная черта заключается в том, что они постоянно проникают через ГЭБ, используя механизм транцитоза. Инсулиновый рецептор, точнее комплекс инсулин-рецептор, транспортируется через ГЭБ с помощью рецептор-опосредованного транцитоза для доставки инсулина из крови в мозг, что обеспечивает регуляцию нейроэндокринных функций, контроль аппетита, когнитивных способностей и памяти.

Данный механизм независимо был использован в Японии и России для создания ЛП на основе трансляционно слитого (фьюжн) химерного белка, в котором одна часть является доставляемым грузом (лизосомальный фермент, например идурсульфаза в случае МПС II), а другая — средством доставки [35]. Компании JCR Pharmaceuticals (Япония) и Denali Therapeutics (США) в качестве средства доставки выбрали антитело к рецептору трансферрина, а россий-

ская компания «ГЕНЕРИУМ» — фрагмент антитела к рецептору инсулина. Последняя конструкция «троянского коня», обозначаемая как HIR-Fab-IDS (фьюжн Fab-фрагмента моноклонального антитела к человеческому рецептору инсулина с идуронат-2-сульфотазой), легла в основу разработки препарата Клотилия (веренафусп альфа) (рис. 3). Доклинические исследования показали, что в тканях HIR-Fab-IDS интернализуется так же эффективно, как и IDS без HIR-Fab, но, в отличие от обычной идурсульфазы, эффективно доставляется в ЦНС через ГЭБ. Фьюжн-белок имеет такую же специфическую ферментативную активность, как и обычная идурсульфаза, но, в отличие от нее, нормализует уровень глюкозаминогликанов (гепарансульфат и дерматансульфат) не только в плазме крови, но и в спинномозговой жидкости, что сигнализирует об эффективной доставке и активности HIR-Fab-IDS в ЦНС [36].

Таким образом, «троянские кони», в которых к рецепторам трансферрина или инсулина с помощью специфического антитела нековалентно присоединяется идурсульфаза, используя механизм транцитоза, эффективно доставляют этот лизосомальный фермент в паренхиму мозга, откуда идурсульфаза доставляется в лизосомы нейронов и глии по механизму RME. Диссоциация фьюжн-белка и рецептора происходит в процессе эндоцитоза при понижении pH в эндоцитозном компартменте рециркуляции или в эндосомах целевых клеток.

Кроме таких конечных точек клинических исследований «троянских коней», как снижение уровней токсичных глюкозаминогликанов в спинномозговой жидкости и уменьшения размера селезенки и печени, была отмечена позитивная динамика когнитивного развития детей, получавших препараты пабинофусп-альфа, тивиденофусп-альфа и веренофусп-альфа [37]. Продолжающиеся долгосрочные клинические исследования должны показать, насколько эффективно эти препараты могут компенсировать соматические и неврологические дефициты у детей с МПС II. Уже сейчас ясно, что это является технологией ФЗТ нового уровня, которая в перспективе позволит компенсировать неврологический дефицит других ЛБН (50 известных ЛБН имеют неврологическую составляющую). Основные вехи развития терапии ЛБН укладываются во временную шкалу, которая представлена в онлайн-приложении (опубликовано на сайте журнала²¹).

²⁰ Elaprase. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/elaprase>

²¹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-127-143-annex>

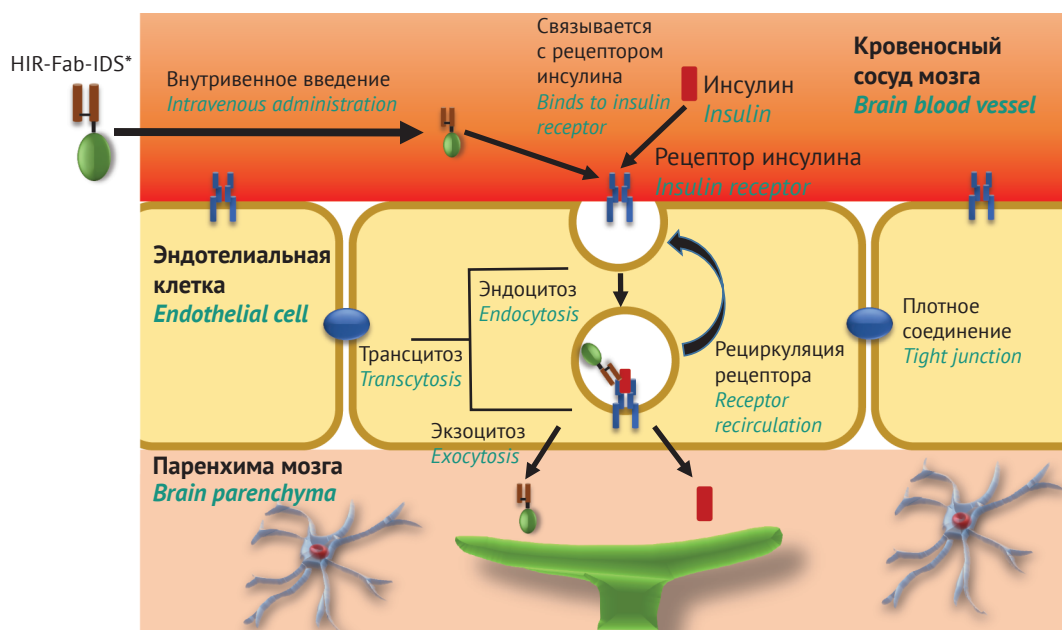


Рисунок составлен авторами / The image was prepared by the authors

Рис. 3. Принцип терапии болезней лизосомного накопления с использованием «тройного коня» на примере химерной молекулы идурсульфазы/антитело к рецептору инсулина (HIR-Fab-IDS). * Идурсульфаза, слитая с антителом к человеческому рецептору инсулина (веренафусп альфа).

Fig. 3. The principle of lysosomal storage diseases therapy using a "Trojan horse" approach, the chimeric molecule idursulfase/insulin receptor antibody (HIR-Fab-IDS) is given as an example. * Idursulfase fused with antibody to human insulin receptor (verenafusp alfa).

Причины успеха и неудач на пути разработки ЛС для орфанных заболеваний

Из более чем 7–8 тыс. известных в мире ОЗ патогенетическая или этиотропная терапия существует в отношении не более чем 400 заболеваний, что составляет <5% от общего числа редких болезней. Большинство ОЗ остаются неизлечимыми, а лечение направлено на облегчение симптомов²². Препятствия успешной разработке ЛС для ОЗ кроме коммерческих включают комплекс биологических, медицинских и технологических проблем.

1. Многообразие механизмов патогенеза делает неэффективным воздействие только на один процесс. Пример такого ОЗ – боковой амиотрофический склероз [38]. Семейная парциальная липодистрофия 2-го типа – заболевание, связанное с мутациями, влияющими на функционирование жировой ткани. Несмотря на связь гена *LMNA* с данным заболеванием, точные пути, ведущие к потере жировой ткани, инсулинорезистентности и другим проблемам, до конца не ясны [39].
2. Сложность целевой доставки препарата (особенно в случае ГенЛП АСО, мПНК, ААВ),

серьезные побочные эффекты, неудачный дизайн клинических исследований, примером чего является болезнь Хантингтона [40].

3. Редкость и гетерогенность мутаций создают ситуацию, когда разрабатываемый препарат может подойти лишь единичным пациентам, например в случае *STXBP1*-ассоциированной эпилептической энцефалопатии [41].
4. Поздняя и неточная диагностика. Пациенты с редкими заболеваниями могут годами страдать от отсутствия правильного диагноза, в результате чего болезнь часто наносит необратимый урон организму. Этиотропная терапия наиболее эффективна на ранних стадиях, а запаздывание с ее началом снижает потенциальную пользу. Например, пациенты с различными формами MODY-диабета (*HNFA-MODY* или *ABCC8-MODY*) часто ошибочно получают лечение от сахарного диабета 1-го или 2-го типа. К моменту постановки точного генетического диагноза они уже могут иметь осложнения заболевания, а возможность применить простую и эффективную этиотропную терапию препаратами сульфонилмочевины вместо инсулина может быть частично упущена [42].

²² <https://rarediseases.org/understanding-rare-disease/rare-disease-facts-and-statistics/>

5. Недостаточный уровень готовности технологии. Так, технологии редактирования генома на основе систем CRISPR считаются одними из самых перспективных для этиотропной коррекции многих моногенных ОЗ. Несмотря на свой потенциал, терапевтическое редактирование генов на основе систем CRISPR сталкивается с рядом проблем [43]. Нецелевое редактирование геномных сайтов и неполное редактирование целевых генов являются серьезными барьерами для наиболее перспективного и безопасного вида этой технологии – редактирования цитозиновых или пуриновых оснований. В настоящее время технология CRISPR в качестве ГТ одобрена только как процедура *ex vivo* с последующей аутотрансплантацией «отредактированных» клеток (экзагамглоджин ототемсел, Casgevy, для лечения бета-талассемии и тяжелой серповидноклеточной анемии). Для применения *in vivo* необходимо дальнейшее совершенствование безопасности и эффективности данной технологии [43].

Пути развития терапии моногенных ОЗ

Гемофилия. Патогенетическая терапия заболевания использовалась с самого начала. Развитие терапии происходило в сторону доступности, удобства применения и переносимости, повышения безопасности и преодоления рефрактерных форм гемофилии. Современные ЛП, шунтирующие каскад свертываемости крови, не уступают или превосходят ГТ по эффективности и являются более безопасными ввиду встречаемости у ГенЛП на основе AAV тяжелых, вплоть до жизнеугрожающих, аутоиммунных реакций на препарат [44]. Они также превосходят ГТ по широте охвата популяции пациентов, поскольку, в отличие от ГенЛП, могут назначаться детям, пациентам с хроническими заболеваниями печени или ингибиторной формой гемофилии и не зависят от конкретного типа гемофилии (А или В).

Муковисцидоз. Эволюция лечения МВ характеризовалась постепенным движением от симптоматической терапии, тем не менее модифицирующей течение заболевания и с каждым новым шагом увеличивающей продолжительность жизни пациентов, к патогенетическому лечению. Последним стало применение малых молекул, потенциаторов и корректоров мутантного ионного канала CFTR (принципиальная молекулярная мишень терапии МВ). Терапия молекулами этой группы пока не охватывает весь спектр патогенных мутаций CFTR. Представляется вероятным, что терапия, начатая на пресимптоматической

стадии у пациентов с мутациями CFTR, спектр которых соотносится с показаниями этих ЛП, может привести к асимптоматическому течению заболевания на протяжении жизни. Генная терапия МВ ввиду трудностей с доставкой и биодоступностью ГенЛП пока находится в зачаточной стадии.

СМА. Терапия СМА была патогенетической с самого начала и эволюционировала в сторону удобства и переносимости, но не в сторону доступности. В будущем одним из основных векторов развития терапии СМА должно стать снижение ее стоимости.

ЛБН. До недавнего времени классическая ФЗТ ЛБН эволюционировала экстенсивно, сосредоточившись в основном на гликоинжиниринге рекомбинантных лизосомальных ферментов для повышения эффективности доставки в лизосомы целевых тканей. Появление технологий, позволяющих доставлять ЛП в ЦНС, позволило совершить качественный скачок в терапии неврологической компоненты ЛБН. Пока не ясна эффективность разрабатываемой генозаместительной терапии ЛБН на основе AAV в долгосрочной перспективе и нет достаточных данных о снижении уровня экспрессии трансгена с течением времени, редактирование генома *in vivo* будет считаться наиболее перспективной ГТ.

Исторические уроки терапии ОЗ имели широкие последствия для всей фармацевтической индустрии. Например, трагедия с инфицированием ВИЧ при лечении гемофилии повлияла на формирование современных норм безопасности биофармацевтического производства. Не менее важным является то, что успех ряда инновационных орфанных препаратов привел к изменению регуляторных требований к одобрению ЛП, сокращению пути от разработки до пациента и повышению доступности таких ЛП.

Регуляторные аспекты разработки орфанных препаратов (ОП)

Вывод ОП на биофармацевтический рынок сопряжен с высокими затратами и длительными сроками исследований, а малый размер целевой популяции делает разработку ОП коммерчески непривлекательной для большинства фармацевтических компаний. Таким образом, ключевым условием для обеспечения доступа пациентов к терапии становится активная государственная поддержка и специальные регуляторные и социальные программы.

За последнее десятилетие на национальном уровне и в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС) был принят ряд важных законодательных мер, направленных на стимулирование сегмента ОЗ. Меры существенно упростили

и ускорили процедуры регистрации, что напрямую повлияло на сокращение сроков доступа пациентов к современному лечению. К числу ключевых механизмов поддержки можно отнести следующие.

1. Процедура условной регистрации позволяет зарегистрировать препарат на основе неполных данных при условии завершения разработчиком всех необходимых исследований в установленный срок после выхода препарата на рынок. Следует подчеркнуть, что такой подход критически важен для ОП, в отношении которых проведение полномасштабных клинических испытаний (III фаза) часто затруднено из-за малого числа пациентов, а особенно ввиду отсутствия терапевтических опций для пациентов, обреченных на крайне неблагоприятный исход.
2. Возможность научного консультирования экспертной организацией позволяет разработчику снизить риски ошибок на ранних этапах разработки и, соответственно, сократить затраты и время вывода препарата на рынок.
3. Процедура ускоренной регистрации, сокращающая сроки проведения регистрации и экспертизы.
4. Процедура регистрации в исключительных случаях, применяемая для крайне редких заболеваний, когда предоставление исчерпывающих данных об эффективности и безопасности объективно невозможно.
5. Освобождение от необходимости предоставления протокола испытаний первых трех серий лекарственного препарата, впервые произведенного в Российской Федерации.
6. Освобождение от необходимости представления образцов, специфических реагентов и других материалов при невозможности проведения испытаний в экспертной организации.
7. Возможность получения государственных субсидий и грантов на разработку и локализацию производства в рамках программ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации²³.
8. Приоритетное рассмотрение для включения в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, что открывает путь к массовым государственным закупкам.
9. Высокие шансы на включение в специальную государственную программу льготного обеспечения «14 высокочувствительных нозологий»,

что может гарантировать стабильную и долгосрочную реализацию продукции за счет средств федерального бюджета.

10. Поддержка со стороны не только государственных структур, но и медицинского сообщества, пациентских организаций и благотворительных фондов, которые напрямую участвуют в закупках и финансировании терапии для пациентов с редкими заболеваниями.

11. Для российского производителя статус ОП может стать дополнительным аргументом при получении льгот по программам локализации (например, в рамках «Фарма-2030») и участия в госзаказах с преференциями для отечественных препаратов.

Несмотря на формирование столь разветвленной и в целом благоприятной регуляторной среды, в практике вывода ОП на рынок сохраняются ряд системных трудностей. Основной сложностью является то, что определение статуса орфанности в ЕАЭС остается на национальном, а не наднациональном уровне (табл. 1). Разные критерии в государствах-членах приводят к парадоксальной ситуации: препарат, зарегистрированный, например, по условной процедуре в одной стране, не может быть одновременно выведен на рынок другого государства-члена, где он не признан орфанным в связи с отсутствием полных данных, необходимых для регистрации без особых условий. Это приводит к фрагментации единого рынка и задержке доступа пациентов к терапии.

Данная ситуация связана в первую очередь с отсутствием гармонизированного подхода в каждом государстве – члене ЕАЭС к определению орфанности и утверждению перечней, которые формируются на основании распространенности этих заболеваний в популяции. Так, например, в России в списке ОЗ указано 297 нозологий, в Беларуси – 151, в Казахстане – около 70, а в Киргизии и Армении национальные перечни ОЗ отсутствуют. Более того, даже если препарат будет признан орфанным во всех государствах-членах, процедура регистрации в разных странах все равно может отличаться; например, в Беларуси только оригинальные орфанные ЛП могут регистрироваться по условной процедуре.

Еще одной сложностью является процедура научного консультирования, которая так же согласно правилам ЕАЭС проводится в соответствии с национальным законодательством государств-членов, что не гарантирует единый

²³ Постановление Правительства Российской Федерации от 16.11.2019 № 1464 «Об утверждении Правил предоставления субсидий из федерального бюджета российским организациям на финансовое обеспечение части затрат на реализацию проектов по разработке современных технологий, организации производства и реализации на их основе конкурентоспособных лекарственных препаратов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации».

Таблица 1. Трактовка орфанного статуса заболевания и препарата в странах ЕАЭС
Table 1. Interpretation of orphan status of disease and medicinal product in the EAEU countries

Страна <i>Country</i>	Российская Федерация <i>Russian Federation</i>	Республика Беларусь <i>Republic of Belarus</i>	Кыргызская Республика <i>Kyrgyz Republic</i>	Республика Казахстан <i>Republic of Kazakhstan</i>	Республика Армения <i>Republic of Armenia</i>
Формулировка <i>Definition</i>	Лекарственный препарат (-ы), предназначенный (-ые) исключительно* для диагностики, этиопатогенетического или патогенетического лечения редких заболеваний, частота которых не превышает официально установленного уровня, определяемого уполномоченным государственным органом в сфере здравоохранения** <i>A medicinal product(s) intended exclusively* for the diagnosis, etiopathogenetic or pathogenetic treatment of rare diseases, the frequency of which does not exceed the officially established level determined by the designated governmental state authority**</i>			Формулировка отсутствует, но приводятся критерии определения орфанных заболеваний и лекарственных средств <i>The definition is lacking, but criteria for defining orphan diseases and medicinal products are provided</i>	Лекарства, предназначенные для лечения редких заболеваний (с частотой 1:10000) <i>Medicines intended for the treatment of rare diseases (with a frequency of 1:10,000)</i>
Распространенность орфанного (редкого) заболевания в популяции (не более чем) <i>Prevalence of an orphan (rare) disease in the population (no more than)</i>	10 случаев на 100 тыс. чел. <i>1 case per 10,000</i>	1 случай на 10 тыс. чел. <i>1 case per 10,000</i>	10 случаев на 100 тыс. чел. <i>10 cases per 100,000</i>	50 случаев на 100 тыс. чел. <i>50 cases per 100,000</i>	1 случай на 10 тыс. чел. <i>1 case per 10,000</i>

Таблица составлена авторами на основе анализа нормативных документов ЕАЭС / The table was prepared by the authors based on the analysis of the EAEU regulatory documents

Примечание. * Выделенный цветом текст применим только в определении для Российской Федерации.

** Выделенный цветом текст применим только в определении для Кыргызской Республики.

Note. * Text highlighted in bold applies only to the definition for the Russian Federation.

** Text highlighted in bold applies only to the definition for the Kyrgyz Republic.

подход экспертов разных стран и организаций к предоставленным по результату консультирования данным.

Рассматривая мировую практику регулирования ОП, можно выделить несколько универсальных принципов успеха. В условиях множества стран, как в ЕС, ключевым решением становится создание централизованных и гармонизированных процедур с универсальными критериями определения орфанного статуса и процессом его присвоения, что в конечном итоге обеспечивает единство рынка. В США, Японии и Китае можно отметить поддержку государства, включая прямое субсидирование разработок, а также научное консультирование с регуляторным органом с самого начала разработки. Приведенные данные в *таблице S2* (онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала²⁴) наглядно демонстрируют как общие принципы, так и важные различия в их реализации между ведущими рынками. Именно в данном контексте становятся видны одни из направлений для дальнейшего развития регуляторной политики ЕАЭС для создания привлекательной и конкурентной среды для разработчиков ОП:

1. Унификация критериев присвоения орфанного статуса и формирование единого перечня редких заболеваний для всего ЕАЭС. Это фундаментальная основа, которая устраним

текущую фрагментацию рынка и позволит рассматривать население ЕАЭС как единую целевую популяцию, что повысит коммерческую привлекательность проектов.

2. Создание наднациональной, централизованной процедуры научного консультирования, результаты которого будут признаваться всеми экспертными организациями государств-членов. Это снимет риски, связанные с разночтениями в оценках и ожиданиях, и предоставит разработчику надежную дорожную карту, согласованную с регуляторным органом до начала дорогостоящих исследований.
3. Гармонизация самой процедуры регистрации и меры поддержки, такие как условная регистрация, подходы к ускоренному рассмотрению и, в перспективе, введение наднациональной рыночной эксклюзивности. Последнее, как показывает мировой опыт, является мощным стимулом для инноваций.

Таким образом, переход к единым, прозрачным и предсказуемым правилам для всего ЕАЭС не является лишь техническим улучшением. Это стратегический шаг, который позволит превратить регуляторную систему в активный инструмент привлечения передовых терапевтических разработок, обеспечивая тем самым равный и своевременный доступ к лечению для всех пациентов с редкими заболеваниями на пространстве ЕАЭС.

²⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-127-143-annex>

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эволюция терапии моногенных орфанных заболеваний, рассмотренная на примере гемофилии, МВ, СМА и ЛБН, демонстрирует поступательное движение медицины от симптоматического лечения к этиотропным стратегиям, направленным на первопричину болезни.

Разнообразие путей развития. История терапии ОЗ не линейна. На примере гемофилии видна эволюция в сторону безопасности и удобства — от применения плазмы к рекомбинантным факторам и препаратам шунтирующего действия. МВ иллюстрирует многолетний путь накопления симптоматических методов, которые привели к росту выживаемости и лишь затем — к созданию патогенетических модуляторов CFTR. В противоположность этому терапия СМА развивалась взрывными темпами: от полного терапевтического бессилия до появления сразу трех классов эффективных лекарств в течение одного десятилетия.

Технологические прорывы как драйверы изменений. Ключевыми вехами стали: разработка технологий рекомбинантной ДНК (факторы свертывания, ферменты для ФЗТ), появление платформ для модификации экспрессии генов (антисмысловые олигонуклеотиды для терапии СМА, миРНК для терапии гемофилии) и создание ГенЛП на основе AAV-векторов (СМА, гемофилия). Особого внимания заслуживает преодоление ГЭБ с помощью технологии «троянского коня» (фьюжн-белки с антителами к белкам для переноса через ГЭБ, такие как рецепторы трансферрина или инсулина), что открывает новые возможности для терапии нейродегенеративных компонентов ЛБН и других заболеваний ЦНС.

Коммерческие и этические вызовы. Высокая стоимость инновационных орфанных препаратов и проблемы с их окупаемостью остаются серьезными барьерами. Пример коммерческого провала некоторых программ генной терапии гемофилии показывает, что даже технологически

успешный продукт может не найти массового спроса, если существующие альтернативы, пусть и требующие регулярного введения, являются более безопасными, понятными и доступными для пациентов и врачей.

Ключевая роль фундаментальной науки и диагностики. Успех терапии напрямую зависит от глубины понимания патогенеза (например, идентификация гена *SMN2* как мишени для СМА). Кроме того, эффективность этиотропной терапии, особенно генной и таргетной, критически зависит от сроков начала лечения. Внедрение программ неонатального скрининга, как в случае со СМА, становится необходимым условием для максимальной реализации потенциала этих препаратов.

Необходимость совершенствования регуляторной среды. Существующие в мире меры поддержки разработки орфанных препаратов (рыночная эксклюзивность, налоговые льготы, ускоренные процедуры регистрации) доказали свою эффективность. Однако в рамках ЕАЭС сохраняется фрагментация подходов: различные критерии орфанности и отсутствие наднациональной рыночной эксклюзивности снижают привлекательность единого рынка для разработчиков. Гармонизация законодательства, создание единого перечня ОЗ и централизованных процедур научного консультирования являются стратегическими задачами для повышения доступности современных методов лечения на всем постсоветском пространстве.

Таким образом, опыт последних десятилетий свидетельствует о трансформации подхода к ОЗ, которые перестали быть «безнадежными» и перешли в область наиболее интенсивного развития биомедицинских технологий. Дальнейший прогресс будет связан не только с созданием новых методов генной и клеточной терапии, но и с выстраиванием эффективных регуляторных, экономических и социальных механизмов, обеспечивающих равный доступ пациентов к этим достижениям.

Литература/References

- Franchini M, Mannucci PM. The more recent history of hemophilia treatment. *Semin Thromb and Hemost.* 2022; 48(8):904–10. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1756188>
- Румянцев АГ, Румянцев СА, Чернов ВМ. Гемофилия в практике врачей различных специальностей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. Rumyantsev AG, Rumyantsev SA, Chernov VM. *Hemophilia in the practice of physicians of various specialties.* Moscow: GEOTAR-Media; 2013 (In Russ.). EDN: [VHJICH](https://doi.org/10.1055/s-0042-1756188)
- Catelli DH, Portich JP, Calvache ET, et al. Hemophilia: a biography on therapeutical approaches. *Clin Biomed Res.* 2023; 43(1):69–74. <https://doi.org/10.22491/2357-9730.126437>
- Hemophilia A and B: Global drug forecast and market analysis to 2030.* London: Global Data; 2021.
- Егорова ТВ, Пискунов АА, Потеряев ДА. Генная терапия наследственных заболеваний на основе аденоассоциированных вирусных векторов: современные проблемы применения и пути их решения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2024;24(2):123–39. Egorova TV, Piskunov AA, Poteryaev DA. Adeno-associated virus vector-based gene therapy for hereditary diseases: current problems of application and approaches to solve them. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2024;24(2):123–39 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-123-139>
- Navarro S. Historical compilation of cystic fibrosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2016;39(1):36–42 (In Spanish). <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.04.012>
- Shire SJ. Stability characterization and formulation development of recombinant human deoxyribonuclease I [Pulmozyme®, (Dornase Alpha)]. In: *Formulation, characterization, and stability of protein drugs: case histories.* Boston: Springer; 2002. P. 393–426. https://doi.org/10.1007/0-306-47452-2_11
- Cystic fibrosis patients in Canada live nearly a decade longer than those in US, study finds. *BMJ.* 2017;356:j1346. <https://doi.org/10.1136/bmj.j1346>
- Сафронова НС, Машковская ДВ, Козелько ЕВ. Пути повышения эффективности кинезитерапии у детей с муковисцидозом. *Современные вопросы биомедицины.* 2022;6(1):50. Safronova NS, Mashkovskaya DV, Kozel'ko EV. Ways to increase the effectiveness of kinesiotherapy in children with cystic fibrosis. *Modern Issues of Biomedicine.* 2022;6(1):50 (In Russ.). https://doi.org/10.51871/2588-0500_2022_06_01_50
- Chaudary N. Triplet CFTR modulators: Future prospects for treat-

- ment of cystic fibrosis. *Ther Clin Risk Manag.* 2018;14:2375–83. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S147164>
11. Massie J, Robinson PJ, Cooper PJ. The story of cystic fibrosis 1965–2015. *J Paediatr Child Health.* 2016;52(11):991–4. <https://doi.org/10.1111/jpc.13309>
 12. Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, et al. The future of cystic fibrosis care: A global perspective. *Lancet Respir Med.* 2020;8(1):65–124. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30337-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30337-6)
 13. Allen L, Allen L, Carr SB, et al. Future therapies for cystic fibrosis. *Nat Commun.* 2023;14(1):693. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36244-2>
 14. Sui H, Xu X, Su Y, et al. Gene therapy for cystic fibrosis: Challenges and prospects. *Front Pharmacol.* 2022;13:1015926. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1015926>
 15. Kireeva TN, Zhigalina DI, Skryabin NA. Cystic fibrosis therapy: From symptoms to the cause of the disease. *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):279–89. <https://doi.org/10.18699/vjgb-25-31>
 16. Liu X, Campos-Gomez J, Luo M, et al. LUNAR LNP delivery of CFTR mRNA restores channel function and improves mucociliary clearance in ferret cystic fibrosis airways. *Mol Ther.* 2026;34(4):2044–62. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.12.040>
 17. Carrozzo I, Maule G, Gentile C, et al. Functional rescue of F508del-CFTR through revertant mutations introduced by CRISPR base editing. *Mol Ther.* 2025;33(3):970–85. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.01.011>
 18. Nishio H, Niba ETE, Saito T, et al. Spinal muscular atrophy: The past, present, and future of diagnosis and treatment. *Int J Mol Sci.* 2023;24(15):11939. <https://doi.org/10.3390/ijms241511939>
 19. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995;80(1):155–65. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3)
 20. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, et al. Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med.* 2017;377(18):1723–32. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702752>
 21. Hoy SM. Onasemnogene ABEPAROVOC: First global approval. *Drugs.* 2019;79(11):1255–62. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01162-5>
 22. Kokaliaris C, Evans R, Hawkins N, et al. Long-term comparative efficacy and safety of risdiplam and nusinersen in children with type 1 spinal muscular atrophy. *Adv Ther.* 2024;41(6):2414–34. <https://doi.org/10.1007/s12325-024-02845-6>
 23. Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(7):554–65. <https://doi.org/10.1038/nrm1423>
 24. de Duve C. From cytosols to lysosomes. *Fed Proc.* 1964;23:1045–9. PMID: 14209796
 25. Solomon M, Muro S. Lysosomal enzyme replacement therapies: Historical development, clinical outcomes, and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;118:109–34. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.004>
 26. Ago Y, Rintz E, Musini KS, et al. Molecular mechanisms in pathophysiology of mucopolysaccharidosis and prospects for innovative therapy. *Int J Mol Sci.* 2024;25(2):1113. <https://doi.org/10.3390/ijms25021113>
 27. Kobayashi H. Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Brain Dev.* 2025;47(5):104399. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2025.104399>
 28. Suzuki Y. Chemical chaperone therapy for GM1-gangliosidosis. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(3):351–3. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7470-2>
 29. Platt FM, Jeyakumar M. Substrate reduction therapy. *Acta Paediatr.* 2008;97(457):88–93. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.00656.x>
 30. Biffi A. Hematopoietic stem cell gene therapy for storage disease: Current and new indications. *Mol Ther.* 2017;25(5):1155–62. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.025>
 31. Narita K, Choudhury A, Dobrenis K, et al. Protein transduction of Rab9 in Niemann-Pick C cells reduces cholesterol storage. *FASEB J.* 2005;19(11):1558–60. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2714fje>
 32. Folts CJ, Scott-Hewitt N, Pröschel C, et al. Lysosomal re-acidification prevents lysosphingolipid-induced lysosomal impairment and cellular toxicity. *PLoS Biol.* 2016;14(12):e1002583. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002583>
 33. Medina DL, Fraldi A, Bouche V, et al. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev Cell.* 2011;21(3):421–30. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.016>
 34. Nishijima K, Okuzaki Y. Pharmaceutical protein production by transgenic chickens: Several viewpoints towards the next stage. *Protein Expr Purif.* 2026;240:106900. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2026.106900>
 35. Leal AF, Inci OK, Seyrantepe V, et al. Molecular Trojan Horses for treating lysosomal storage diseases. *Mol Genet Metab.* 2023;140(3):107648. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107648>
 36. Научно-практическая конференция «Достижения и перспективы российских биотехнологий в лечении мукополисахаридоза II типа». *Педиатрическая фармакология.* 2025;22(6):768–72. Scientific and practical conference "Achievements and prospects of Russian biotechnologies in the treatment of type II mucopolysaccharidosis". *Pediatric Pharmacology.* 2025;22(6):768–72 (In Russ.). <https://doi.org/10.15690/pf.v22i6.2998>
 37. Okuyama T, Eto Y, Sakai N, et al. A phase 2/3 trial of pabinafusp alfa, IDS fused with anti-human transferrin receptor antibody, targeting neurodegeneration in MPS-II. *Molecular Therapy.* 2021;29(2):671–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.09.039>
 38. Hamad AA, Alkhalwaldeh IM, Nashwan AJ, et al. Tofersen for SOD1 amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci.* 2025;46(5):1977–85. <https://doi.org/10.1007/s10072-025-07994-2>
 39. Fernandez-Pombo A, Diaz-Lopez EJ, Castro AI, et al. Clinical spectrum of LMNA-associated type 2 familial partial lipodystrophy: A systematic review. *Cells.* 2023;12(5):725. <https://doi.org/10.3390/cells12050725>
 40. Byun S, Lee M, Kim M. Gene therapy for Huntington's disease: The final strategy for a cure? *J Mov Disord.* 2022;15(1):15–20. <https://doi.org/10.14802/jmd.21006>
 41. Zheng Y, Li F, Shi J. Advances in STXBP1 encephalopathy research and translational opportunities. *J Neurorestoratol.* 2024;12(3):100134. <https://doi.org/10.1016/j.jnrt.2024.100134>
 42. Delvecchio M, Pastore C, Giordano P. Treatment options for MODY patients: A systematic review of literature. *Diabetes Ther.* 2020;11(8):1667–85. <https://doi.org/10.1007/s13300-020-00864-4>
 43. Chehelgerdi M, Chehelgerdi M, Khorramian-Ghahfarokhi M, et al. Comprehensive review of CRISPR-based gene editing: Mechanisms, challenges, and applications in cancer therapy. *Mol Cancer.* 2024;23(1):9. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01925-5>
 44. Mücke MM, Fong S, Foster GR, et al. Adeno-associated viruses for gene therapy – clinical implications and liver-related complications, a guide for hepatologists. *J Hepatol.* 2024;80(2):352–61. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.10.029>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликованы таблицы S1 и S2. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-2-127-143-annex>

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

Благодарности. Авторы благодарны А.О. Кречетову, О.А. Марковой, О.В. Сатышеву за обсуждение рукописи.

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

Supplementary information. Tables S1 and S2 are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.*

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

Acknowledgements. The authors are grateful to A.O. Krechetov, O.A. Markova, and O.V. Satyshev for discussing the manuscript.

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

Об авторах / Authors

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

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

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

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

Поступила 03.03.2026

После доработки 25.04.2026

Принята к публикации 19.06.2026

Received March 3, 2026

Revised April 25, 2026

Accepted June 19, 2026



Доклиническая разработка педиатрических орфанных генотерапевтических препаратов: анализ подходов и проблем (обзор)

А.М. Азарова , Н.А. Гаврилова , М.В. Тихомирова

Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Заводская, стр. 273, пос. Вольгинский, городской округ Покров, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

✉ Азарова Анна Михайловна; azarova@generium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Отсутствие единых регуляторных требований к доклиническим исследованиям (ДКИ) педиатрических орфанных генотерапевтических лекарственных препаратов (ГТЛП) затрудняет их разработку и регистрацию. В обзоре систематизированы основные особенности ДКИ таких препаратов и проанализирован успешный опыт двух зарегистрированных ГТЛП для обоснования подходов к ускорению вывода новых препаратов на рынок.

ЦЕЛЬ. Критический анализ мирового опыта доклинической разработки ГТЛП для выявления ключевых проблем ДКИ и оптимизации дизайна исследований педиатрических орфанных ГТЛП для ускорения их перехода в клиническую практику.

ОБСУЖДЕНИЕ. Анализ литературных источников проводили в базах PubMed, Embase, Google Scholar, eLIBRARY.RU, cyberleninka.ru, а также на сайтах ведущих регуляторных органов за период 2020–2026 гг. В мире зарегистрировано около 20 ГТЛП, включая три препарата в Российской Федерации. Установлено, что дизайн ДКИ педиатрических орфанных ГТЛП базируется на принципе весомости доказательств и требует индивидуального подхода. Ключевыми элементами программы доклинической разработки являются исследование биораспределения вектора и трансгена, оценка экспрессии трансгена в целевых и нецелевых тканях, а также изучение выделения (шеддинга) вектора. Решающим фактором разработки выступает валидация модели на животных по клинически значимым конечным точкам. На примере препарата Элевидис для лечения мышечной дистрофии Дюшенна продемонстрирована важность оценки функциональных исходов (двигательная активность) и коррекции гистологических изменений (уменьшение некроза мышечной ткани), а на примере препарата Золгенсма для лечения спинальной мышечной атрофии — значимость снижения летальности как основной конечной точки. Выявлено, что оценка безопасности ГТЛП сопряжена с необходимостью анализа неопределенностей (долгосрочные риски, иммуногенность), которые регуляторные органы признают допустимыми в условиях отсутствия альтернативной терапии. Полученные данные подтверждают необходимость раннего взаимодействия разработчиков с регуляторными органами для оптимизации программ ДКИ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Систематизированы особенности доклинической разработки педиатрических орфанных ГТЛП, ключевыми из которых являются гибкость дизайна на основе принципов весомости доказательств, проведение исследования биораспределения трансгена и самого вектора, приоритет функциональных конечных точек, тщательная валидация модели на животных и раннее взаимодействие с регуляторными органами. Практическая значимость работы заключается в обосновании подхода, позволяющего разработчикам оптимизировать программы ДКИ, а экспертам регуляторных органов — гармонизировать оценку эффективности и безопасности, что ускорит выход жизненно важных препаратов в клиническую практику для педиатрических пациентов с орфанными заболеваниями.

Ключевые слова: генная терапия; орфанные заболевания; педиатрия; доклинические исследования; генотерапевтические препараты; модели на животных; медицинская правдоподобность; весомость доказательств; конечные точки; биораспределение; безопасность лекарственных препаратов; эффективность лекарственных препаратов

Для цитирования: Азарова А.М., Гаврилова Н.А., Тихомирова М.В. Доклиническая разработка педиатрических орфанных генотерапевтических препаратов: анализ подходов и проблем (обзор). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(2):144–158. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-144-158>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Preclinical development of pediatric orphan gene therapy medicinal products: Analysis of approaches and challenges (review)

Anna M. Azarova , Natalia A. Gavrilova , Mariia V. Tikhomirova 

GENERIUM JSC, 273 Zavodskaya St., Volginsky, Pokrov, Vladimir Region 601125, Russian Federation

✉ Anna M. Azarova; azarova@generium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The lack of uniform regulatory requirements for preclinical studies (PCS) of pediatric orphan gene therapy medicinal products (GTMPs) complicates their development and marketing authorization. This review summarizes the key features of PCS for such products and analyzes the successful experience with two registered GTMPs to support approaches for accelerating the market entry of new products.

AIM. This study aimed to critically analyze global experience in the preclinical development of GTMPs to identify key challenges in PCS and to optimize the design of studies on pediatric orphan GTMPs for expediting their translation into clinical practice.

DISCUSSION. A literature search was conducted in PubMed, Embase, Google Scholar, eLIBRARY.RU, cyberleninka.ru, and on the websites of leading regulatory agencies for the period 2020–2026. Currently, about 20 GTMPs are registered worldwide, including three products in the Russian Federation. The design of PCS for pediatric orphan GTMPs was found to be based on the weight-of-evidence principle and requires an individualized approach. Key elements of the preclinical development program include biodistribution studies of the vector and transgene, assessment of transgene expression in target and non-target tissues, and evaluation of vector shedding. The critical success factor is validation of the animal model using clinically relevant endpoints. Using Elevidys (Duchenne muscular dystrophy) as an example, the importance of assessing functional outcomes (motor activity) and correcting histological changes (reduction of muscle tissue necrosis) was demonstrated, while Zolgensma (spinal muscular atrophy) illustrated the significance of mortality reduction as the primary endpoint. The safety assessment of GTMPs is associated with the need to analyze uncertainties (long-term risks, immunogenicity), which regulatory authorities consider acceptable in the absence of alternative therapy. The obtained data confirm the necessity of early engagement between developers and regulators to optimize PCS programs.

CONCLUSIONS. The performed analysis has systematized the specific features of preclinical development of pediatric orphan GTMPs, the key ones being flexibility of design based on weight-of-evidence principles, biodistribution studies of the transgene and the vector itself, prioritization of functional endpoints, thorough validation of the animal model, and early interaction with regulatory authorities. The practical significance of the work lies in substantiating an approach that enables developers to optimize PCS programs and helps regulatory experts harmonize the assessment of efficacy and safety, thereby accelerating the entry of life-saving medicinal products into clinical practice for pediatric patients with orphan diseases.

Keywords:

gene therapy; orphan diseases; pediatrics; preclinical studies; gene therapy medicinal products; animal models; medical plausibility; weight of evidence; endpoints; biodistribution; medicinal product safety; medicinal product efficacy

For citation:

Azarova A.M., Gavrilova N.A., Tikhomirova M.V. Preclinical development of pediatric orphan gene therapy medicinal products: Analysis of approaches and challenges (review). *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(2):144–158. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-144-158>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Редкие (орфанные) заболевания характеризуются высокой неудовлетворенной медицинской потребностью. Для большинства таких заболеваний варианты лечения ограничены или отсутствуют, при этом значительная доля приходится на детский возраст. Разработка методов лечения орфанных заболеваний у детей является актуальной проблемой в мире и в Российской Федерации; в последнее десятилетие этому направлению уделяется большое внимание на государственном уровне.

Международная классификация болезней (МКБ-11) включает регулярно обновляемый список около 5500 редких заболеваний¹. Перечень Минздрава Российской Федерации на 03.04.2026 содержит 297 орфанных заболеваний². В России к орфанным относят редкие патологии с распространенностью не более 10 случаев на 100 тыс. населения³. Эти состояния часто угрожают жизни или приводят к хронической инвалидизации, что подчеркивает необходимость разработки эффективных методов лечения. Для большинства орфанных заболеваний отсутствуют альтернативные варианты лечения.

Сложность доклинической разработки орфанных препаратов связана прежде всего с поиском терапевтической мишени и разработкой экспериментальной модели на животных, адекватно отражающей патофизиологию заболевания у человека. Как правило, такая модель создается с использованием платформенных технологий и требует дополнительных временных и материальных ресурсов. Такие модели помогают выяснению этиологии и патофизиологии заболеваний и важны для открытия и разработки новых методов лечения [1]. Однако прогностическая способность *in vivo* моделей в оценке эффективности и выборе доз может быть низкой из-за значительных видовых различий метаболизма у животных и человека [2].

Другим важным аспектом разработки орфанных препаратов является необходимость проведения терапии до появления необратимых патофизиологических изменений в организме, что обуславливает лечение преимущественно в педиатрической популяции. Редкость заболевания и малое количество пациентов ограничивают проведение полноценных крупномасштабных клинических исследований для доказательства эффективности и безопасности лекарственных препаратов (ЛП). Поэтому доклинические данные должны убедительно обосновывать безопасность перехода к клиническим исследованиям и эффективность лечения.

Одним из наиболее перспективных направлений патогенетической терапии таких заболеваний является генная терапия, направленная на манипуляцию экспрессией определенного гена или изменение биологических свойств клеток, предназначенная для однократного введения. Генотерапевтические лекарственные препараты (ГТЛП) согласно Федеральному закону Российской Федерации № 61-ФЗ – «лекарственные препараты, фармацевтическая субстанция которых является рекомбинантной нуклеиновой кислотой или включает в себя рекомбинантную нуклеиновую кислоту, позволяющую осуществлять регулирование, репарацию, замену, добавление или удаление генетической последовательности»⁴. ГТЛП оптимальны для педиатрических орфанных заболеваний, поскольку наследственные заболевания часто манифестируют в младенчестве или детстве, а длительный терапевтический эффект наиболее значим при раннем начале терапии. Достижение длительного эффекта при однократном введении лекарственного препарата – главное преимущество ГТЛП.

С учетом технологии производства и области применения к разработке ГТЛП применимы регуляторные требования к высокотехнологичным,

¹ <https://www.who.int/standards/classifications/frequently-asked-questions/rare-diseases>

² <https://minzdrav.gov.ru/documents/9863-perechen-redkih-orfannyh-zabolevaniy>

³ Федеральный закон РФ от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

⁴ Там же.

орфанным и педиатрическим препаратам⁵. Единые подходы к проведению ДКИ орфанных ГТЛП отсутствуют. Это обусловлено относительно небольшим опытом разработки таких препаратов и их экспертной оценки (активное развитие – в последнее десятилетие), широким спектром ГТЛП и быстрым развитием молекулярно-генетических технологий.

Цель работы – критический анализ мирового опыта доклинической разработки ГТЛП для выявления ключевых проблем ДКИ и оптимизации дизайна исследований педиатрических орфанных ГТЛП для ускорения их перехода в клиническую практику.

Анализ литературных источников проводили в базах PubMed, Embase, Google Scholar, eLIBRARY.RU, cyberleninka.ru, а также сайтах ведущих регуляторных органов⁶ за период 2020–2026 гг. Поиск проводили с использованием ключевых слов: «генная терапия», «орфанные заболевания», «лекарственные препараты для передовой терапии (ATMP)», «доклинические исследования», «gene therapy», «orphan disease», «advanced therapy medicinal products (ATMP)», «preclinical development».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Нормативно-правовое и научно-методическое регулирование, регламентирующее доклинические исследования педиатрических орфанных ГТЛП

Согласно Решению Совета Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) № 78⁷ орфанные

препараты предназначены для лечения, диагностики или профилактики редких болезней. Генная терапия основана на введении пациенту препаратов, содержащих рекомбинантные нуклеиновые кислоты, генетически модифицированные микроорганизмы или вирусы⁸. Генная терапия может осуществляться путем доставки функциональной копии гена в клетку, редактирования генома эндонуклеазами или использования онколитических вирусов. Основные требования к проведению ДКИ безопасности педиатрических препаратов представлены в Руководстве по экспертизе лекарственных средств⁹, а также в обзоре Г.Н. Енгальцевой и Р.Д. Сюбаева [3]. Подходы к доклинической оценке безопасности ГТЛП и риски их применения описаны ранее [4–6].

Стратегия ДКИ для педиатрических орфанных ГТЛП основывается на их фармакологических и физико-химических характеристиках, показаниях, возрасте пациентов, тяжести заболевания (включая скорость прогрессирования), дизайне клинических исследований, доступности альтернативных методов лечения и ожидаемых рисках с учетом накопленных доклинических и клинических данных¹⁰. При составлении программы ДКИ рекомендуется применять подход весомости доказательств (weight of evidence, WoE) для обоснования безопасности ЛП и целесообразности проведения или исключения отдельных видов токсикологических исследований¹¹. Анализ всех доступных доклинических данных критически важен

⁵ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

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

Guideline on clinical trials in small populations. CHMP/EWP/83561/2005. EMA; 2007.

Решение Коллегии ЕЭК от 26.11.2019 № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use. EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev. 2. EMA; 2013.

Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

ICH guideline S11 on nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals – Step 5. EMA/CHMP/ICH/616110/2018. EMA; 2020.

⁶ <https://www.ema.europa.eu/>

<https://www.fda.gov/>

<https://www.hma.eu/>

<https://www.gov.uk/government/organisations/medicines-and-healthcare-products-regulatory-agency>

⁷ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

⁸ Chemistry, manufacturing, and control information for human gene therapy investigational new drug applications. Guidance for industry. 2008-D-0205. FDA; 2020.

⁹ Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 3. Экспертиза качества и безопасность лекарственных средств. М.: Типография Миттель Пресс; 2025.

¹⁰ Pediatric drug development: regulatory considerations – complying with the pediatric research equity act and qualifying for pediatric exclusivity under the best pharmaceuticals for children act. FDA-2005-D-0460. FDA; 2023.

Human gene therapy for rare diseases. Guidance for industry. FDA-2018-D-2258. CDER, FDA; 2020.

Rare diseases: considerations for the development of drugs and biological products; Guidance for industry. FDA-2015-D-2818. FDA, CDER/CBER; 2023.

¹¹ ICH S1B(R1) Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals. EMA/774371/2022. EMA, 2022.

ICH S5 (R3) guideline on detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals – Step 5 – Revision 4. EMA/CHMP/ICH/544278/1998. EMA; 2023.

для планирования и интерпретации результатов ДКИ, а также для экспертизы безопасности.

Программа ДКИ ГТЛП, в том числе педиатрических, включает исследования специфической активности, фармакокинетики и общетоксического действия, которые рекомендуется объединять. Для ГТЛП исследования фармакокинетики, как правило, заменяют исследованиями биораспределения в тканях. Дополнительно оценивают риск для окружающей среды (экотоксичность), вертикальный перенос генов и инсерционный мутагенез. Токсические эффекты необходимо оценить в отношении самого ГТЛП и продуктов экспрессии. ДКИ способствуют пониманию механизма действия, метаболизма, фармакодинамики и потенциальной эффективности препарата. Данные ДКИ важны для ранних стадий клинической разработки, особенно для выбора начальной дозы, схемы повышения дозы, режима дозирования и способа введения. Доклинические данные помогают в выборе критериев отбора пациентов и определяют процедуры мониторинга безопасности на основе наблюдаемого токсикологического профиля.

Основные требования к проведению ДКИ безопасности ГТЛП изложены в документах Европейского медицинского агентства (European Medicines Agency, EMA), Управления по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (US Food and

Drug Administration, FDA), Международного совета по гармонизации (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) [7]. Однако такие аспекты, как объем и дизайн ДКИ, возможность повторного введения, доказательство безопасности для детей, остаются не полностью регламентированными. В мировой практике эти вопросы обсуждаются при непосредственном взаимодействии разработчика с регуляторными органами в рамках научных консультаций [8].

В нормативных правовых актах Российской Федерации и Евразийского экономического союза конкретные требования к проведению ДКИ ГТЛП отсутствуют. К разработке высокотехнологичных ЛП, в том числе ГТЛП, может применяться подход, основанный на анализе риска для определения объема необходимых сведений и требований к ДКИ [9]. Разработка программы ДКИ направлена на получение сведений, достаточных для оценки соотношения пользы и риска применения препарата у людей. На требования к ДКИ ГТЛП влияют их особенности, связанные с потенциальными *in vivo* эффектами трансгена, вектора (вирусных, бактериальных или плазмидных последовательностей) и вспомогательных веществ.

В таблице 1 обобщены российские и международные требования к объему и видам ДКИ.

Таблица 1. Регуляторные руководства для проведения доклинических исследований педиатрических орфанных ГТЛП
Table 1. Regulatory guidelines for conducting preclinical studies of pediatric orphan GTMPs

Вид исследования <i>Study type</i>	Руководства для ГТЛП/ВТЛП <i>Guidelines for GTMPs/ATMPs</i>	Руководства для орфанных препаратов <i>Guidelines for orphan medicinal products</i>	Руководства для педиатрических препаратов <i>Guidelines for pediatric medicinal products</i>
Фармакодинамика и исследования механизма действия <i>in vitro</i> и/или <i>ex vivo</i> и <i>in vivo</i> <i>Pharmacodynamics and mechanism of action studies in vitro and/or ex vivo and in vivo</i>	EMA/CAT/80183/2014 ^a FDA-2021-D-0398 ^b Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 <i>Decision of the EEC Council of November 3, 2016 No. 78</i>	EMA/420706/2018 Rev. 19 ^m FDA-2015-D-2818 ⁿ Regulation (EC) No. 141/2000 of the European Parliament and of the Council of 16 December 1999 on orphan medicinal products	EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev. 2 ^o EMA/CHMP/ICH/616110/2018 ^p EMA/CHMP/SWP/169215/2005 ^q ICH M3(R2). CPMP/ICH/286/95 ^r ICH E11(R1). CPMP/ICH/2711/99 ^s ICH S5 (R3). EMA/CHMP/ICH/544278/1998 ^t ICH S8. CHMP/167235/200 ^u EMA/536810/200 ^v 2003D-0001 ^w FDA-2005-D-0460 ^x
Токсикология, местная переносимость <i>Toxicology, local tolerance</i>	Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 <i>Decision of the EEC Council of November 3, 2016 No. 89</i>		
Фармакокинетика/биораспределение и длительность экспрессии <i>Biodistribution and persistence</i>	EMA/CHMP/ICH/318372/2021 ^c EMA/CHMP/ICH/449035/2009 ^d		
Репродуктивная токсичность <i>Reproductive toxicity</i>	EMA/273974/2005 ^e CHMP/ICH/469991/2006 ^f		
Экотоксичность <i>Environmental risk assessment</i>	EMA/CHMP/GTWP/125491/2006 ^g EMA/CHMP/ICH/449035/2009 ^d		
Исследования для первого применения у человека <i>Preclinical studies (before first-in-human use)</i>	EMA/CHMP/GTWP/125459/2006 ^h		

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Вид исследования <i>Study type</i>	Руководства для ГТЛП/ВТЛП <i>Guidelines for GTMPs/ATMPs</i>	Руководства для орфанных препаратов <i>Guidelines for orphan medicinal products</i>	Руководства для педиатрических препаратов <i>Guidelines for pediatric medicinal products</i>
Исследования модификаций дизайна ГТЛП <i>Studies of design modifications of GTMPs</i>	EMA/CAT/GTWP/44236/2009 ^j	Приведены выше / <i>Listed above</i>	Приведены выше / <i>Listed above</i>
Исследования рекомбинант- ных аденоассоциированных вирусных векторов <i>Studies of recombinant adeno- associated viral vectors</i>	EMA/CHMP/ GTWP/587488/2007 Rev. 1/ ^j		
Исследования онколитических вирусных векторов <i>Studies of oncolytic viral vectors</i>	EMA/CHMP/ ICH/607698/2008 ^k		
Исследование лентивирусных векторов <i>Studies of lentiviral vectors</i>	CHMP/BWP/2458/03 ^l		
Другие исследования токсич- ности: иммуногенность и имму- нотоксичность, вертикальный перенос генов, инсерционный мутagenез и онкогенный по- тенциал, провоспалительный цитокиновый шторм и др. <i>Other toxicity studies: immunogenicity and immunotoxicity, vertical germline transmission, insertional mutagenesis and oncogenic potential, pro-inflammatory cytokine storm, etc.</i>	FDA-2021-D-0398 ^b Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 <i>Decision of the EEC Council of November 3, 2016 No. 78</i>		

Таблица составлена авторами / The table was prepared by the authors

Примечание. ГТЛП — генотерапевтический лекарственный препарат; ВТЛП — высокотехнологичный лекарственный препарат; ЕЭК — Евразийская экономическая комиссия.

Note. GTMP, gene therapy medicinal product; ATMP, advanced therapy medicinal product; EEC, Eurasian Economic Commission.

^a Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. EMA; 2018.

^b Human gene therapy products incorporating human genome editing; Guidance for industry. FDA-2021-D-0398. FDA, CBER; 2024.

^c ICH guideline S12 on nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products — Step 2b. Scientific guideline; Step 5. EMA/CHMP/ICH/318372/2021. EMA; 2023.

^d ICH consideration: General principles to address virus and vector shedding. Scientific guideline. EMA/CHMP/ICH/449035/2009. EMA; 2009.

^e Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors. Scientific guideline. EMA/273974/2005. EMA; 2006.

^f International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use considerations: General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors. CHMP/ICH/469991/2006. EMA; 2006.

^g Guideline on scientific requirements for the environmental risk assessment of gene therapy medicinal products. EMA/CHMP/GTWP/125491/2006. EMA; 2008.

^h Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. EMA/CHMP/GTWP/125459/2006. EMA; 2008.

ⁱ Reflection paper on design modification of gene therapy medicinal products during development. EMA/CAT/GTWP/44236/2009. EMA; 2009.

^j Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors. EMA/CHMP/GTWP/587488/2007 Rev. 1. EMA; 2007.

^k International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use considerations: Oncolytic viruses. EMA/CHMP/ICH/607698/2008. EMA; 2009.

^l Guideline on development and manufacture of lentiviral vectors. CHMP/BWP/2458/03. EMA; 2005.

^m Procedural advice for orphan medicinal product designation: Guidance for sponsors. EMA/420706/2018 Rev. 19. EMA; 2026

ⁿ Rare diseases: considerations for the development of drugs and biological products; Guidance for industry. FDA-2015-D-2818. FDA, CDER/CBER; 2023.

^o Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use. EMA/CHMP/QWP/805880/2012 Rev. 2. EMA; 2013.

^p ICH guideline S11 on nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals — Step 5. EMA/CHMP/ICH/616110/2018. EMA; 2020.

^q Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for paediatric indications. EMA/CHMP/SWP/169215/2005. EMA; 2008.

^r ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals — Step 5. CPMP/ICH/286/95. EMA; 2013.

^s ICH guideline E11(R1) on clinical investigation of medicinal products in the paediatric population — Revision 1 (addendum). EMA/CPMP/ICH/2711/1999. EMA; 2018.

^t ICH S5 (R3) guideline on detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals — Step 5 — Revision 4. EMA/CHMP/ICH/544278/1998. EMA; 2023.

^u ICH guideline S8 on immunotoxicity studies for human pharmaceuticals — Step 5. ICH Topic S8. CHMP/167235/2004. EMA; 2006.

^v Guideline on the investigation of medicinal products in the term and preterm neonate — First version. EMA/536810/2008. EMA; 2010.

^w Nonclinical safety evaluation of pediatric drug products. 2003D-0001. FDA, CDER; 2006.

^x Pediatric drug development: regulatory considerations — complying with the pediatric research equity act and qualifying for pediatric exclusivity under the best pharmaceuticals for children act. FDA-2005-D-0460. FDA; 2023.

Для всех категорий ЛП, перечисленных в *таблице 1*, регуляторные органы рекомендуют анализ рисков на основе WoE, гибкость дизайна исследований и проведение ранних консультаций. Для орфанных ГТЛП, сочетающих признаки всех трех групп препаратов, именно WoE становится основополагающим принципом доклинической разработки, что обусловлено механизмом действия, структурой и биологическими свойствами таких препаратов. В *таблице 2* приведены основные виды ДКИ для орфанных ГТЛП и биологических лекарственных препаратов (БЛП) заместительной терапии в соответствии с требованиями Решения Совета ЕЭК № 89. В отличие от стандартной терапии БЛП разработка ГТЛП дополнительно включает исследование

длительности экспрессии трансгена в целевых тканях, оценку экспрессии терапевтического продукта в нецелевых тканях как часть токсикологических исследований, а также оценку шеддинга и интеграции векторной ДНК в геном млекопитающих как часть специфических исследований безопасности.

Обязательное тестирование животных на наличие предсуществующих антител обеспечивает релевантность результатов оценки эффективности и безопасности ГТЛП. Успешность разработки ГТЛП обусловлена наличием надежной экспериментальной модели и разработкой методов оценки экспрессии трансгена в крови и тканях животных с использованием ортогонального подхода на уровне ДНК, мРНК и белка.

Таблица 2. Виды доклинических исследований для орфанных ГТЛП и биологических лекарственных препаратов (БЛП) заместительной терапии

Table 2. Types of preclinical studies for orphan GTMPs and enzyme replacement therapy (ERT) biologics

Вид исследования <i>Study type</i>	Подход для БЛП заместительной терапии <i>Approach for ERT biologics</i>	Подход для орфанных ГТЛП <i>Approach for orphan GTMPs</i>
Биологическая активность <i>in vitro</i> и механизм действия <i>Biological activity in vitro and mechanism of action</i>	Ферментативный анализ или клеточная модель, полученная от пациентов <i>Enzymatic assay or patient-derived cell model</i>	Модифицированная клеточная линия, чувствительная к вектору <i>Modified vector-sensitive cell line</i>
Фармакодинамика <i>Pharmacodynamics</i>	Оценка терапевтического эффекта на модельных нокаутных животных по суррогатным биохимическим точкам. Возможно проведение исследований с радиоактивной меткой для исследования интернализации фермента <i>Evaluation of the therapeutic effect in knockout animal models using surrogate biochemical endpoints. Radiolabeled studies to investigate enzyme internalization, if possible</i>	Оценка функционального ответа (прижизненные и гистологические тесты) и длительности эффекта на модельных нокаутных животных <i>Evaluation of the functional response by intravital and histological tests and the duration of the therapeutic effect in knockout animal models</i>
Фармакокинетика и биораспределение <i>Pharmacokinetics and biodistribution</i>	Оценка экспозиции препарата в крови нокаутных или здоровых животных <i>Evaluation of drug exposure in the blood of knockout or healthy animals</i>	Исследования биораспределения вектора и трансгена. Оценка длительности экспрессии трансгена. Исследование шеддинга вектора <i>Vector and transgene biodistribution studies. Assessment of transgene expression duration. Vector shedding studies</i>
Токсичность на грызунах и других видах млекопитающих, в том числе исследования на ювенильных животных <i>Toxicity in rodents and other mammalian species, including studies in juvenile animals</i>	Стандартная программа исследования хронической токсичности с оценкой токсикокинетики <i>Standard chronic toxicity study program with toxicokinetics assessment</i>	Индивидуальный дизайн исследования, включающий оценку экспрессии трансгена в нецелевых тканях и органах. Включение отдельных конечных точек безопасности в исследование фармакодинамики <i>Individualized study design, including assessment of transgene expression in non-target tissues and organs. Inclusion of individual safety endpoints in the pharmacodynamic study</i>
Токсичность на приматах <i>Primate toxicity</i>	Взрослые приматы <i>Adult primates</i>	Взрослые приматы с премедикацией <i>Adult primates with premedication</i>
Токсичность на ювенильных приматах <i>Toxicity in juvenile primates</i>	Ювенильные приматы <i>Juvenile primates</i>	Ювенильные приматы <i>Juvenile primates</i>
Репродуктивная токсичность <i>Reproductive toxicity</i>	Грызуны <i>Rodents</i>	Может быть обосновано отсутствие исследований <i>The lack of a study may be justified</i>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

Вид исследования <i>Study type</i>	Подход для БЛП заместительной терапии <i>Approach for ERT biologics</i>	Подход для орфанных ГТЛП <i>Approach for orphan GTMPs</i>
Исследования интеграции в геном <i>Genome integration studies</i>	Не требуется <i>Not required</i>	Оценка интеграции векторной ДНК в геном млекопитающих <i>Evaluation of vector DNA integration into the mammalian genome</i>
Иммуногенность <i>Immunogenicity</i>	В рамках исследования токсичности <i>As part of a toxicity study</i>	Обязательный скрининг животных на наличие предсуществующих антител к вектору <i>Mandatory screening of animals for the presence of pre-existing antibodies to the vector</i>
Иммуотоксичность <i>Immunotoxicity</i>	Не требуется <i>Not required</i>	В рамках исследований общей токсичности <i>As part of general toxicity studies</i>
Исследование шеддинга вектора и оценка экотоксичности <i>Vector shedding and ecotoxicity study</i>	Не требуется <i>Not required</i>	В рамках исследований общей токсичности <i>As part of general toxicity studies</i>
Вертикальный перенос генов, инсерционный мутагенез, онкогенный потенциал, провоспалительный цитокиновый шторм и др. <i>Vertical germline transmission, insertional mutagenesis, oncogenic potential, pro-inflammatory cytokine storm, etc.</i>	Не требуется <i>Not required</i>	В рамках исследований общей токсичности <i>As part of general toxicity studies</i>

Таблица составлена авторами / The table was prepared by the authors

Примечание. ГТЛП — генотерапевтический лекарственный препарат.
Note. GTMP, gene therapy medicinal product.

Модели животных для доклинической разработки ГТЛП

Особенностью разработки орфанных ГТЛП является отсутствие четких патофизиологических маркеров заболевания и сложность выбора терапевтической мишени. Мутации генов при орфанных заболеваниях, как правило, характеризуются широким спектром точечных мутаций, вариабельностью клинических симптомов и их тяжестью [10–13]. Разработка экспериментальной модели, адекватно отражающей патофизиологическую картину заболевания у человека, как правило, требует получения нокаутных линий животных и их валидации по комплексу клинических симптомов заболевания для экстраполяции полученных результатов оценки эффективности на человека. Получение таких линий не всегда возможно [14]. В некоторых случаях модели не пригодны для оценки эффективности, но помогают выяснению этиологии и патофизиологии заболеваний. Прогностическая способность *in vivo* моделей может быть низкой из-за видовых различий в чувствительности к вектору и проявлений симптомов заболевания при мутациях, а также различий в скорости метаболизма у животных и человека [15, 16].

В европейских регуляторных документах для характеристики орфанных ЛП используется термин «медицинская правдоподобность» [17, 18]. Медицинская правдоподобность (обоснованность) представляет собой демонстрацию разработчиком «намерения лечить», подтверждающую целесообразность разработки продукта и его предполагаемую клиническую пользу. Для этого необходимо представить данные, полученные на пациентах, или доклинические результаты на модели заболевания, демонстрирующие фармакодинамическую активность ЛП, имеющую отношение к заболеванию [19]. Комитет по орфанным препаратам EMA (Committee for orphan medicinal products) публикует обзоры моделей *in vivo* с наилучшей прогностической ценностью. Основным фактором успешной разработки являются релевантность модели и дизайна исследования [14, 18, 20].

Для описания прогностической ценности экспериментальной модели заболевания применим подход, представленный на рисунке 1. Блок-схема отражает процесс принятия решения о медицинской правдоподобности данных, полученных с использованием модели. Первый шаг анализа — валидация экспериментальной модели, учитывающей генетические особенности

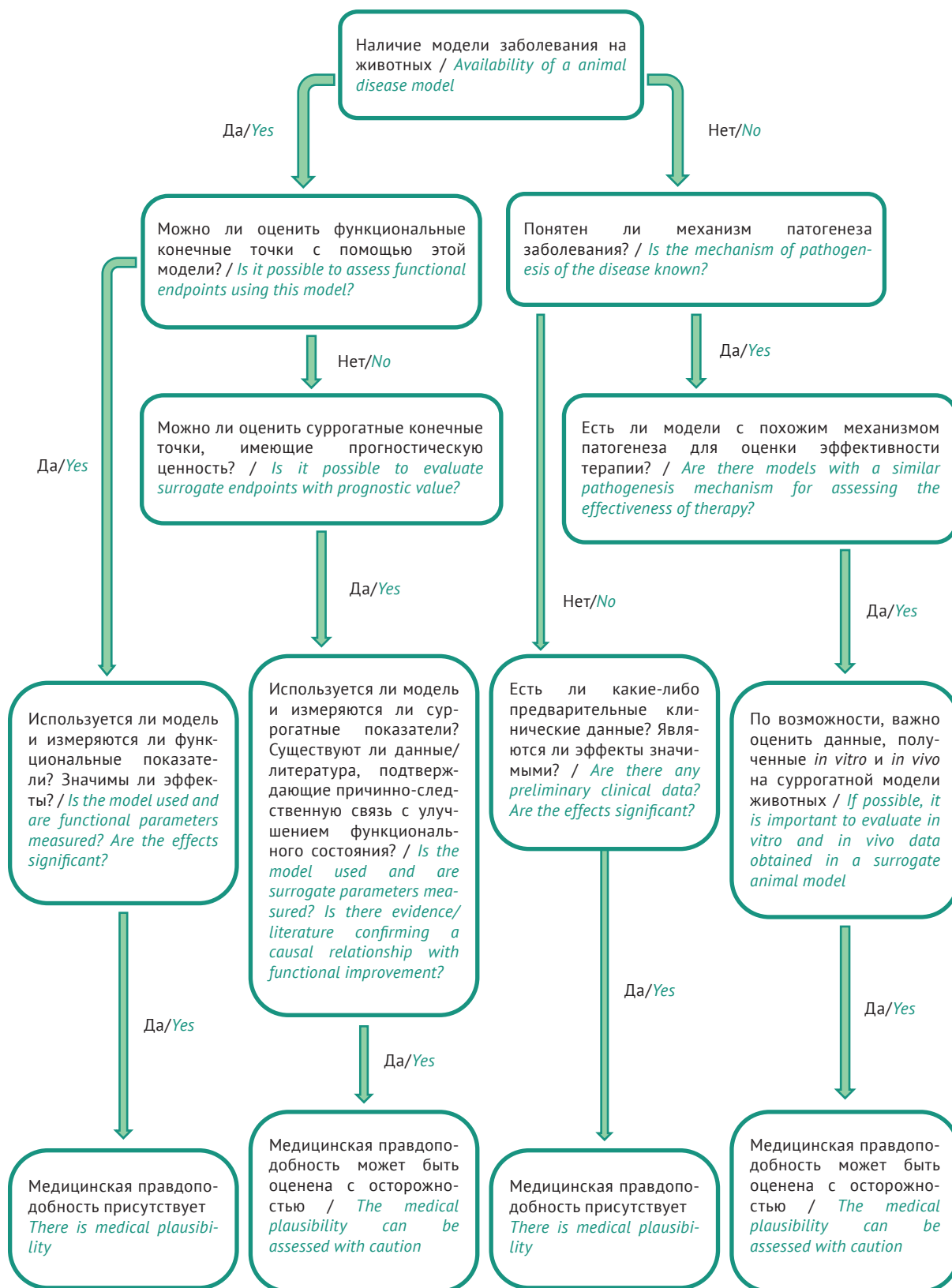


Рисунок подготовлен авторами / The figure was prepared by the authors

Рис. 1. Алгоритм оценки медицинской правдоподобности данных, полученных с использованием доклинической модели животных.

Fig. 1. Algorithm for assessing the medical plausibility of data obtained using a preclinical animal model.

заболевания и его клинические проявления. Затем рассматривается возможность оценки функционального ответа на терапию или использование суррогатных маркеров. Недостатки прогностической модели и даже неопределенность механизма действия ЛП могут быть частично компенсированы результатами *in vitro* или пилотными клиническими данными.

Примеры моделей для доклинической разработки

Примером успешной доклинической разработки ГТЛП с использованием надежной экспериментальной прогностической модели является разработка зарегистрированного для лечения мышечной миодистрофии Дюшенна (МДД) препарата Элевидис. Фармакологические исследования Элевидиса проводились на двух моделях грызунов: на мышах линии *mdx* и крысах линии *Dmd^{mdx}* [21–23]. Эти модели хорошо охарактеризованы по количественно измеряемым функциональным параметрам, соответствующим клиническому прогрессированию заболевания.

Мышечная дистрофия Дюшенна — X-сцепленное рецессивное нервно-мышечное заболевание, вызванное мутациями в гене дистрофина¹². К основным проявлениям МДД относятся мышечная слабость и задержка моторного развития в раннем возрасте; ко второму десятилетию жизни большинство пациентов прикованы к инвалидному креслу [24]. На поздних стадиях наблюдаются сердечные и респираторные осложнения, приводящие к ранней смерти [25]. Молекулярно-генетическая причина МДД — мутация гена, кодирующего белок дистрофин, участвующего в связывании актинового цитоскелета мышечной клетки с внеклеточным матриксом через дистрофин-гликопротеиновый комплекс [26].

МДД хорошо изучена на мышинных моделях [27]. Наиболее распространенная модель на мышах — линия *mdx*, у которой присутствует преждевременный стоп-кодон в экзоне 23, что приводит к потере полноразмерного дистрофина [28]. У этих мышей фенотип мышечной патологии мягче по сравнению с тяжелой мышечной дисфункцией у человека [29]. Фенотип характеризуется некрозом мышечных волокон и воспалительной инфильтрацией с 3-й недели жизни. После 4-недельного периода некроза и повышения уровня креатинкиназы

патологический процесс замедляется из-за компенсаторной экспрессии утrophина у мышей, что отличается от человека [30]. Мыши линии *mdx* имеют сокращенную продолжительность жизни и прогрессирующую дистрофическую мышечную патологию.

В качестве суррогатных точек используют биохимические маркеры (креатинин, АЛТ, АСТ). Для модели *mdx* разработаны протоколы методик оценки основных фармакодинамических параметров¹³. Основными конечными точками оценки эффективности при ДКИ Элевидиса являлись положительная динамика спонтанной активности животных, повышение уровня миокродистрофина в скелетных мышцах и сердце, нормализация функции сердца (в сравнении с нелеченым контролем)¹⁴. Используемые модели позволили подтвердить концепцию об эффективности ЛП, выбрать терапевтическую дозу для клинической разработки и полностью соответствовали подходу медицинской правдоподобности.

Спинальная мышечная атрофия (СМА) — ауто-сомно-рецессивное заболевание, приводящее к потере двигательных нейронов вследствие снижения уровня белка SMN (survival motor neuron) из-за мутаций в гене *SMN1*. Белок SMN кодируется генами *SMN1* и *SMN2*. Развитие 5q-ассоциированной СМА обусловлено мутациями в гене *SMN1*. Ген *SMN2* — высокоомологичная копия *SMN1*, присутствующая у всех пациентов, но не способная предотвратить заболевание. Критической точкой является замена цитозина на тимин в экзоне 7 гена *SMN2*, создающая сайт связывания для репрессора сплайсинга; вследствие этого основной транскрипт *SMN2* не содержит экзона 7 и функционально неполноценен¹⁵ [23]. Тяжесть симптомов заболевания ассоциирована с числом копий *SMN2*¹⁶.

Для оценки доклинической эффективности ГТЛП Золгенсма для лечения СМА использована модель мышей линии *SMNΔ7* (генотип *SMN2^{7y/+}; SMNΔ7^{y/+}; Smn^{-/-}*), соответствующая наиболее тяжелой форме СМА (отсутствие транскрипта гена *SMN1* и неполноценный транскрипт гена *SMN2*). Основной конечной точкой оценки эффективности препарата являлось снижение летальности по сравнению с контролем. Модель подтвердила концепцию эффективности и позволила перейти к клинической разработке, показав

¹² Клинические рекомендации «Прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна. Прогрессирующая мышечная дистрофия Беккера». Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2023.

¹³ <https://www.treat-nmd.org/resources-and-support/sop-library/mdx-mouse-dmd/>

¹⁴ Elevidys. Pharmacology/Toxicology Review. FDA; 2023.

¹⁵ <https://compbio.berkeley.edu/people/ed/rust/Dystrophin.html>

¹⁶ Клинические рекомендации. «5q-ассоциированная спинальная мышечная атрофия». Миздрав России; 2024.

воздействие на наиболее тяжелое звено патогенеза в соответствии с подходом медицинской правдоподобности.

Изучение эффективности

Для орфанных заболеваний с неизвестным механизмом развития часто отсутствуют модели животных для оценки эффективности потенциальных ЛП, поэтому в ДКИ используют *in vitro* модели (иммортизированные клеточные линии, эксплантаты тканей, клеточные культуры из образцов пациентов) и *ex vivo* модели (например, фибробласты пациентов). При наличии релевантной модели животных крайне важен гибкий подход при оценке ее прогностической способности или медицинской правдоподобности. В качестве конечных точек оценки эффективности следует использовать параметры, отражающие динамику патологического процесса у человека и валидированные для модели с возможностью количественной оценки терапевтического эффекта. В примерах ДКИ зарегистрированных ГТЛП в качестве конечных точек оценки фармакодинамики использовали как основные функциональные, так и дополнительные суррогатные параметры: повышение двигательной активности и мышечной силы, биохимические маркеры крови (мышь *mdx*); снижение летальности (мышь SMNΔ7).

Неотъемлемой частью фармакодинамических исследований ГТЛП является оценка продолжительности терапевтического эффекта и длительности экспрессии белка-трансгена в тканях-мишенях. Для обоих препаратов ключевой конечной точкой было подтверждение синтеза целевого белка в тканях-мишенях: в скелетных мышцах (Элевидис) или тканях головного и спинного мозга (Золгенсма); максимальная длительность исследований в обоих случаях составляла 6 мес.

Возраст модельных животных является значимым фактором для проявления основных клинических симптомов и экстраполяции полученных данных на человека. Введение препарата Элевидис более возрастным (3–5-месячным) мышам *mdx* не привело к каким-либо статистически значимым улучшениям в тесте «открытое поле» или дистрофической патологии мышц, несмотря на подтвержденную экспрессию микродистрофина в скелетных мышцах и сердце¹⁷. Эти результаты соответствуют клинической картине необратимых изменений

при МДД и подтверждают важность раннего начала терапии орфанных генетических заболеваний до развития необратимых изменений. Фармакологические исследования на мышах линии SMNΔ7 проводили при однократном внутривенном введении препарата новорожденным мышам (1–2 дни жизни), что обосновано особенностями модели и высокой летальностью без проведения терапии, что также соответствует клинической картине СМА. Оценку возрастной динамики клинических проявлений заболевания необходимо проводить на этапе валидации модели, включая анализ корреляции между возрастом дебюта заболевания у ребенка и возрастом животного на модели с учетом видовых особенностей.

Исследования биораспределения при оценке эффективности проведены для обоих препаратов на модельных животных. Экспрессию целевого белка в тканях-мишенях оценивали методом ПЦР (количество ДНК вектора и мРНК трансгена), а для препарата Элевидис также методом Вестерн-блот для оценки полноразмерного микродистрофина. Уровень белка SMN человека в мышечных тканях после введения Золгенсма в рамках ДКИ не определялся¹⁸.

Изучение безопасности

Оценка безопасности ГТЛП помимо исследований общей токсичности включает ряд специальных исследований. При разработке препаратов Элевидис и Золгенсма проведены долгосрочные исследования токсичности на здоровых грызунах (родительской линии дикого типа, соответствующей патологической модели); длительность исследования соответствовала максимальной длительности оценки экспрессии трансгена в исследованиях фармакодинамики. Особенностью оценки безопасности ГТЛП является оценка динамики экспрессии трансгена в нецелевых тканях и органах. Обнаружение ДНК вектора и уровень экспрессии трансгенного белка в нецелевых тканях (печень, репродуктивная система, почки и др.), а также оценка длительности персистенции вектора в крови дают важную информацию для оценки безопасности препарата и рисков как для пациента, так и экологического риска (экотоксичность) [31]. В рамках исследования экотоксичности оценивают длительность периода выявления вектора в биологических жидкостях животных после введения препарата.

¹⁷ Клинические рекомендации. «5q-ассоциированная спинальная мышечная атрофия». Миздрав России; 2024.

¹⁸ Summary basis for regulatory action – ZOLGENSMA (BLA 125694). FDA; 2019.

Assessment report. Zolgensma. INN: onasemnogene abeparvovec, Procedure No. EMEA/H/C/004750/0000. EMA; 2020.

При оценке безопасности препарата Элевидис исследований на приматах не проводились, что было обусловлено видоспецифичностью серотипа вектора¹⁹. Однако в дополнительных исследованиях на приматах была проведена оценка возможности многократного введения препарата на фоне иммуносупрессивной терапии и влияние иммуносупрессии на биораспределение препарата на 12 и 24 нед. после внутривенного введения. В оценке безопасности препарата Золгенсма также отсутствовали исследования на приматах, за исключением двух краткосрочных не-GLP исследований биораспределения меченого препарата при интратекальном и внутривенном введении. Результаты подтвердили наличие трансгена в мотонейронах спинного мозга животных при внутривенном введении. Исследования на приматах выявили новый потенциальный риск – инфильтрацию моноклеарных клеток в спинальных ганглиях, сопровождающуюся воспалением и повреждением (дегенерацией) нейронов при интратекальном введении препарата²⁰. Информация о необходимости мониторинга сенсомоторных нейронов у пациентов, получающих препарат, внесена в медицинские документы.

Для препарата Элевидис явлений токсичности в изучаемом диапазоне доз практически не выявлено. Исключение составляли случаи гидроцефалии, которая считается фоновым явлением для мышей линии *mdx*, выявлявшаяся также в контрольных группах животных без лечения. Для препарата Золгенсма во всех дозовых группах отмечены признаки кардио- и гепатотоксичности, а также летальные дозозависимые тромбозы. В связи с этим уровень NOAEL (no observed adverse effect level) был определен условно как доза, не приводящая к летальному тромбозу.

Исследования репродуктивной и эмбриональной токсичности, а также генотоксичности не проводились ни для одного из двух препаратов. Разработчики сослались на литературные данные о низкой частоте случайной интеграции в геном и отсутствии канцерогенного потенциала для рекомбинантных векторов AAV²¹. Регуляторные органы сочли это обоснование приемлемым.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ регуляторных документов и двух примеров разработки педиатрических

орфанных ГТЛП (Элевидис, Золгенсма) позволяет выявить ряд закономерностей и нерешенных вопросов.

Для стимулирования разработки новых препаратов для терапии тяжелых наследственных заболеваний регуляторными органами разных стран внедрены специальные процедуры, обеспечивающие раннюю регистрацию орфанных препаратов. Важным аспектом разработки ГТЛП является создание релевантной экспериментальной модели патологии, которая в соответствии с подходом медицинской правдоподобности должна иметь функциональные проявления заболевания, схожие с таковыми у человека. Знание биомаркеров прогрессирования заболевания позволит адекватно оценить эффективность новой терапии на доклиническом этапе и прогнозировать клинический ответ.

Подход, применяемый в разработке орфанных ЛП, включает оценку прогностической ценности экспериментальной модели и интеграцию в анализ WoE всех совокупных данных об эффективности (результаты *in vitro*, клинические данные, открытые данные о препаратах со сходным механизмом действия или способом получения). Это позволяет получить ясную картину клинической целесообразности разработки – ее медицинской правдоподобности в терминологии европейских регуляторных органов [3, 4, 7, 9]. История разработки двух наиболее изученных препаратов для лечения МДД и СМА показывает, что понимание молекулярно-генетических особенностей заболевания и связи генетических изменений с клиническими проявлениями и их тяжестью необходимо для разработки эффективных методов терапии.

Описанный в статье подход к разработке ГТЛП (индивидуальный дизайн, научные консультации) соответствует мировой практике [1–9, 32]. Изложенные положения могут быть использованы разработчиками при планировании программ ДКИ, а также экспертами регуляторных органов для гармонизации подходов к оценке эффективности и безопасности ГТЛП. Дальнейшие исследования должны быть направлены на анализ опыта постмаркетингового наблюдения за зарегистрированными препаратами для уточнения долгосрочных рисков и оптимизации требований к новым продуктам генной терапии.

Описанные примеры моделей заболеваний на животных показали, что даже

¹⁹ Summary basis for regulatory action – Elevidys (BLA STN 125781/0). FDA; 2023.

Assessment report. Elevidys. INN: delandistrogene moxeparvovec, Procedure No. EMEA/H/C/005293/0000. EMA; 2025.

²⁰ Summary basis for regulatory action – ZOLGENSMA (BLA 125694). FDA; 2019.

²¹ Там же.

«несовершенные» модели (*mdx*) могут быть полезны при разработке орфанных ЛП для педиатрической популяции, что не согласуется с критикой в литературе [20]. Ценность моделей СМА и МДД заключается в отражении ключевого звена патогенеза заболевания.

Феномен кардиотоксичности, наблюдавшейся в ДКИ только у Золгенсма, далее подтвердился в клинике для обоих препаратов. По данным ряда исследователей, сверхэкспрессия трансгена в организме животного может приводить к токсическим проявлениям, включая кардиотоксичность или нарушение экспрессии полноразмерного белка [31, 33]. Несмотря на неоднозначную транслируемость этих нежелательных явлений на человека и возможность снижения рисков на фоне иммуносупрессивной терапии, случаи нежелательного воздействия на сердце наблюдались при клиническом применении обоих препаратов. Последующие исследования выявили связь между видом трансгена и порогом чувствительности грызунов к кардиопатологии [34].

При разработке педиатрических орфанных ГТЛП важно учитывать неопределенности и риски, связанные с прогнозом безопасности: горизонтальное и вертикальное распространение генетического материала, иммуногенность, нецелевой мутагенез, долгосрочные побочные эффекты (выявляемые через 6 и более мес. после введения препарата), интеграция вектора в геном, экологические риски (обусловленные шеддингом вектора). Многие из этих эффектов изучаются постфактум. В то же время высокая эффективность на модельных животных и отсутствие альтернативной терапии жизнеугрожающих заболеваний служат весомым основанием для перехода препарата в клиническую фазу разработки.

Настоящий обзор имеет ограничения. Во-первых, анализ ограничен двумя наиболее изученными препаратами, что не позволяет экстраполировать выводы на все классы ГТЛП (например, технологию CRISPR/Cas). Во-вторых, ориентация на педиатрических пациентов ограничивает возможность обобщения полученных выводов для других возрастных групп.

Накопление опыта доклинической и клинической разработки ГТЛП требует постоянного пересмотра регуляторных подходов и использования передовых технологий [35]. Перспективными направлениями разработки ГТЛП являются следующие:

- разработка более совершенных моделей на животных — ксенотрансплантаты от паци-

ентов (patient-derived xenografts, PDX), гуманизированные мыши (humanized mice);

- использование 3D-моделей и органоидов, полученных от человека, для оценки экспрессии трансгенов, клеточного тропизма и токсичности вирусных капсидов до применения *in vivo*;
- совершенствование средств целевой доставки трансгена (модифицированные капсиды AAV, липидные наночастицы) для минимизации нецелевой токсичности и обеспечения тканеспецифичности (например, проникновение через гематоэнцефалический барьер);
- усовершенствование методов редактирования генома (прайм-редактирование и редактирование оснований), что позволяет вносить точные изменения нуклеотидов со значительно сниженным риском хромосомных транслокаций;
- совершенствование методов оценки долгосрочных рисков интеграции;
- гармонизация требований к ДКИ на международном уровне для ускорения вывода препаратов на рынок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ показал, что доклиническая разработка педиатрических орфанных ГТЛП базируется на принципе весомости доказательств (WoE) и индивидуальном дизайне исследований, что обусловлено отсутствием унифицированных регуляторных требований.

Систематизированы особенности доклинической разработки педиатрических орфанных ГТЛП, ключевыми из которых являются гибкость дизайна, приоритет функциональных конечных точек и тщательная валидация моделей животных. Важными элементами программ ДКИ являются замена исследований фармакокинетики оценкой биораспределения, анализ экспрессии трансгена в целевых и нецелевых тканях, изучение шеддинга и интеграции вектора.

На примере препаратов Элевидис и Золгенсма показано, что критическим фактором успеха является наличие релевантной модели на животных, валидированной по клинически значимым конечным точкам (функциональное улучшение, снижение летальности), даже при фенотипических ограничениях модели.

Ускорение разработки и регистрации ГТЛП возможно благодаря раннему взаимодействию с регуляторными органами для подтверждения выбранной стратегии и достаточности объема полученных данных, фокуса на валидации прогностических моделей и применения гибкого подхода к объему исследований на основе анализа рисков.

Сформулированные положения могут быть использованы разработчиками при планировании программ ДКИ, а также экспертами регуляторных органов для гармонизации подходов к оценке эффективности и безопасности ГТЛП и ускорения выхода в клиническую практику

жизненно важных препаратов. Дальнейшие исследования должны быть направлены на анализ опыта постмаркетингового наблюдения для уточнения долгосрочных рисков и оптимизации требований к новым продуктам генной терапии.

Литература/References

1. Miller KL, Fermaglich LJ, Maynard J. Using four decades of FDA orphan drug designations to describe trends in rare disease drug development: substantial growth seen in development of drugs for rare oncologic, neurologic, and pediatric-onset diseases. *Orphanet J Rare Dis*. 2021;16(1):265. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01901-6>
2. Miller KL, Lanthier M. Orphan drug label expansions: analysis of subsequent rare and common indication approvals. *Health Aff (Millwood)*. 2024;43(1):18–26. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2023.00219>
3. Енгальчева ГН, Сюбаев РД. Разработка педиатрических препаратов: ключевые факторы риска и программа доклинических исследований. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):14–26. Engalycheva GN, Syubaev RD. Development of paediatric medicines: Key risk factors and non-clinical research programmes. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):14–26 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-500>
4. Астапова ОВ, Берчатова АА. Генотерапевтические препараты: аспекты доклинического изучения безопасности. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(1):73–96. Astapova OV, Berchatova AA. Gene therapy medicinal products: Non-clinical safety studies. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(1):73–96 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-1-329>
5. Рачинская ОА, Мельникова ЕВ, Меркулов ВА. Особенности дизайна доклинических исследований препаратов генной терапии *in vivo*. Часть 1: фармакологические исследования. *Инновационная медицина Кубани*. 2025;10(4):113–20. Rachinskaya OA, Melnikova EV, Merkulov VA. Design features of nonclinical studies for *in vivo* gene therapy medicinal products. Part 1: Pharmacological studies. *Innovative Medicine of Kuban*. 2025;10(4):113–20 (In Russ.). <https://doi.org/10.35401/2541-9897-2025-10-4-113-120>
6. Рачинская ОА, Мельникова ЕВ, Меркулов ВА. Особенности дизайна доклинических исследований препаратов генной терапии *in vivo*. Часть 2: фармакокинетические и токсикологические исследования. *Инновационная медицина Кубани*. 2026;11(1):148–56. Rachinskaya OA, Melnikova EV, Merkulov VA. Design features of nonclinical studies for *in vivo* gene therapy medicinal products. Part 2: Pharmacokinetic and toxicological studies. *Innovative Medicine of Kuban*. 2026;11(1):148–56 (In Russ.). <https://doi.org/10.35401/2541-9897-2026-11-1-148-156>
7. Warreth S, Harris E. The regulatory landscape for ATMPs in the EU and US: A comparison. *Technol Univ Dublin*. 2020;15:5. <https://doi.org/10.21427/PK3V-G445>
8. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Меркулов ВА. Мировая практика научного консультирования по вопросам разработки и регистрации инновационных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(3):167–77. Melnikova EV, Merkulova OV, Merkulov VA. World practice of providing scientific advice on the development and authorisation of innovative medicines. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(3):167–77 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-167-177>
9. Енгальчева ГН, Сюбаев РД. WoE-анализ и ключевые факторы риска при доклинической разработке лекарственных препаратов: обзор. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2024;12(4):463–76. Engalycheva GN, Syubaev RD. WoE analysis and key risk factors in preclinical development of medicinal products: A review. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2024;12(4):463–76 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2024-12-4-463-476>
10. Guy J, Hendrich B, Holmes M, et al. A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet*. 2001;27(3):322–6. <https://doi.org/10.1038/85899>
11. Gan S, Xu L, Liao H, Wu L. Spectrum of DMD gene mutations in 507 patients: A retrospective genotype-phenotype study using next-generation sequencing. *Arch Pediatr*. 2025;32(8):547–51. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2025.07.002>
12. Ehrhart F, Jacobsen A, Rigau M, et al. A catalogue of 863 Rett-syndrome-causing MECP2 mutations and lessons learned from data integration. *Sci Data*. 2021;8(1):10. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-00794-7>
13. Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, et al. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve*. 2006;34(2):135–44. <https://doi.org/10.1002/mus.20586>
14. Sheean ME, Stoyanova-Beninska V, Capovilla G, et al. Nonclinical data supporting orphan medicinal product designations: Lessons from rare neurological conditions. *Drug Discov Today*. 2018;23(1):26–48. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.015>
15. Pires de Mello CP, Rumsey J, Slaughter V, Hickman JJ. A human-on-a-chip approach to tackling rare diseases. *Drug Discovery Today*. 2019;24(11):2139–51. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.08.001>
16. Haugabook SJ, Ferrer M, Ottinger EA. *In vitro* and *in vivo* translational models for rare liver diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(5):1003–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.07.029>
17. Hofer MP, Hedman H, Mavris M, et al. Marketing authorisation of orphan medicines in Europe from 2000 to 2013. *Drug Discov Today*. 2018;23(2):424–33. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.10.012>
18. Tsigkos S, Hofer MP, Sheean ME, et al. Establishing rarity in the context of orphan medicinal product designation in the European Union. *Drug Discov Today*. 2018;23(3):681–6. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.003>
19. Duarte DM, da Silva Lima MB, Sepodes B. The translational value of animal models in orphan medicines designations for rare paediatric neurological diseases. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2020;118:104810. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104810>
20. Sheean ME, Malikova E, Duarte D, et al. Nonclinical data supporting orphan medicinal product designations in

- the area of rare infectious diseases. *Drug Discov Today*. 2020;25(2):274–91.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.10.015>
21. Potter RA, Griffin DA, Heller KN, et al. Functional and histological improvements comparing 4 micro-dystrophin constructs in the *mdx* mouse model of DMD. In: *American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT) 22nd Annual Meeting*. Washington, DC; 2019.
 22. Potter RA, Griffin DA, Heller KN, et al. Dose-escalation study of systemically delivered rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*. 2019;32(7–8):375–89.
<https://doi.org/10.1089/hum.2019.255>
 23. Larcher T, Lafoux A, Tesson L, et al. Characterization of dystrophin deficient rats: A new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. 2014;9(10):e110371.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110371>
 24. Elangkovan N, Dickson G. Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *J Neuromuscul Dis*. 2021;8(s2):S303–16.
<https://doi.org/10.3233/jnd-210678>
 25. Crisafulli S, Sultana J, Fontana A, et al. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15(1):141.
<https://doi.org/10.1186/s13023-020-01430-8>
 26. Flanigan KM. Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurol Clin*. 2014;32(3):671–88.
<https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.05.002>
 27. Ng R, Banks GB, Hall JK, et al. Animal models of muscular dystrophy. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;105:83–111.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394596-9.00004-4>
 28. Im WB, Phelps SF, Copen EH, et al. Differential expression of dystrophin isoforms in strains of *mdx* mice with different mutations. *Hum Mol Genet*. 1996;5(8):1149–53.
<https://doi.org/10.1093/hmg/5.8.1149>
 29. Chamberlain JS, Metzger J, Reyes M, et al. Dystrophin-deficient *mdx* mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J*. 2007;21(9):2195–204.
<https://doi.org/10.1096/fj.06-7353com>
 30. Matsumura K, Ervasti J, Ohlndieck K, et al. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in *mdx* mouse muscle. *Nature*. 1992;360:588–91.
<https://doi.org/10.1038/360588a0>
 31. Biquand A, Gicquel E, Poupiot J, et al. Transgene-induced cardiotoxicity in high-dose AAV gene transfer. *Mol Ther*. 2026;34(4):2012–27.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2025.12.042>
 32. Aksoy H. Orphan drugs: Review article. *Deneyisel Ve Klinik Tip Dergisi*. 2023;40(4):792–4.
 33. Yue Y, Wasala NB, Bostick B, Duan D. 100-fold but not 50-fold dystrophin overexpression aggravates electrocardiographic defects in the *mdx* model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16045.
<https://doi.org/10.1038/mtm.2016.45>
 34. Abou-El-Enein M, Elsanhoury A, Reinke P. Overcoming challenges facing advanced therapies in the EU Market. *Cell Stem Cell*. 2016;19(3):293–7.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.012>
 35. Liu F, Li R, Zhu Z, et al. Current developments of gene therapy in human diseases. *MedComm*. 2024;5:e645.
<https://doi.org/10.1002/mco2.645>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.М. Азарова** и **Н.А. Гаврилова** — разработка концепции обзора, написание текста рукописи, формулировка выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **М.В. Тихомирова** — написание текста рукописи, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

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

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.M. Azarova** and **N.A. Gavrilova** conceptualized the review, drafted the manuscript, formulated the conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication. **M.V. Tikhomirova** drafted the manuscript and approved the final version of the manuscript for publication.

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

Об авторах / Authors

Азарова Анна Михайловна, канд. биол. наук / **Anna M. Azarova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2901-732X>

Гаврилова Наталья Андреевна, канд. биол. наук / **Natalia A. Gavrilova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4624-9189>

Тихомирова Мария Васильевна / **Mariia V. Tikhomirova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-0762-6325>

Поступила 06.03.2026

После доработки 03.06.2026

Принята к публикации 19.06.2026

Received March 6, 2026

Revised June 3, 2026

Accepted June 19, 2026



Активность CAG-промотора при rAAV-опосредованной генной терапии: тканеспецифичность и возрастная динамика

Р.Л. Анисимов , Н.В. Никифорова , Е.С. Иванов , А.А. Овсепян ,
А.А. Борзов , А.А. Казаров

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

✉ Анисимов Роман Львович; anisimov@ibcgenerium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Несмотря на широкое использование в генотерапевтических препаратах на основе рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (rAAV) искусственных промоторов, основанных на промоторе β -актина курицы (обозначаемых как CAG, CBA или CB), данные об активности таких промоторов в разных тканях и возрастной динамике остаются ограниченными. В настоящей работе проведена количественная оценка активности CAG-промотора в различных органах мышей в постнатальном периоде для определения его применимости при разработке rAAV-опосредованной терапии.

ЦЕЛЬ. Оценка относительной активности CAG-промотора и ее динамики в органах мышей в возрасте 3–12 недель.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. 2-дневным мышам линии ICR (CD-1) однократно вводили rAAV9 с кассетой для экспрессии SMN под контролем CAG-промотора. На 3, 6 и 12-й нед. после инъекции из образцов органов (головной мозг, спинной мозг, печень, легкие, сердце, четырехглавая мышца бедра) выделяли тотальную ДНК и РНК. Содержание вирусных геномов rAAV и мРНК SMN в препаратах нуклеиновых кислот определяли методом количественной ПЦР. Относительную активность промотора рассчитывали как отношение концентрации мРНК SMN к концентрации вирусных геномов (rAAV), нормализованное на соотношение РНК:ДНК в органе. Для анализа данных вычисляли среднее геометрическое и использовали регрессионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Активность CAG-промотора значительно варьировала в разных органах. На 3 нед. после инъекции наибольшие значения активности отмечены в четырехглавой мышце бедра, в 4,7–9,7 раза превышающие таковые в других органах. Также обнаружено, что в головном мозге и легких с 3 по 12 нед. после инъекции активность промотора снижалась в 4,7 раза ($p=0,0094$) и в 5,2 раза ($p=0,0039$) соответственно, в то время как в других тканях существенных изменений активности не наблюдалось.

ВЫВОДЫ. CAG-промотор малопригоден для экспрессии трансгена в клетках легких и головного мозга вследствие транскрипционного сайленсинга, а также не является оптимальным для экспрессии в клетках печени из-за относительно низкой активности. Эти данные следует учитывать при разработке генотерапевтических препаратов.

Ключевые слова: генная терапия; рекомбинантные аденоассоциированные вирусы; rAAV; CAG-промотор; спинальная мышечная атрофия

Для цитирования: Анисимов Р.Л., Никифорова Н.В., Иванов Е.С., Овсепян А.А., Борзов А.А., Казаров А.А. Активность CAG-промотора при rAAV-опосредованной генной терапии: тканеспецифичность и возрастная динамика. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(2):159–170. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-159-170>

Финансирование. Работа проводилась при финансировании АО «ГЕНЕРИУМ».

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

© Р.Л. Анисимов, Н.В. Никифорова, Е.С. Иванов, А.А. Овсепян, А.А. Борзов, А.А. Казаров, 2026
Издатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2026, V. 26, No. 2

Tissue specificity and age-related dynamics of CAG promoter activity in rAAV-mediated gene therapy

Roman L. Anisimov , Natalya V. Nikiforova , Evgeny S. Ivanov ,
Armen A. Ovsepyan , Anton A. Borzov , Alexander A. Kazarov 

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

✉ Roman L. Anisimov; anisimov@ibcgenerium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Artificial promoters based on the chicken beta-actin promoter (CAG, CBA, or CB) are frequently used in recombinant adeno-associated virus (rAAV)-based gene therapy products. However, data on the activity and age-related activity dynamic of these promoters remain quite limited. In this study, we quantitatively assessed CAG promoter activity in various organs of postnatal mice to determine its suitability for the development of rAAV-mediated gene therapy.

AIM. Evaluation of the relative CAG promoter activity and its dynamics in mouse organs from 3 to 12 weeks of life.

MATERIALS AND METHODS. Two-day-old ICR (CD-1) mice were injected once with rAAV9 carrying a cassette for SMN expression under the control of the CAG promoter. At 3, 6, and 12 weeks after administration, total DNA and RNA were isolated from organ samples (brain, spinal cord, liver, lungs, heart, quadriceps femoris muscle). The content of rAAV genomes and SMN mRNA in nucleic acid preparations were determined by quantitative PCR. Relative promoter activity was calculated as the ratio of the SMN mRNA concentration to the concentration of rAAV genomes, normalized on the RNA:DNA ratio in the organ. Data were analyzed using the geometric mean and regression analysis.

RESULTS. CAG promoter activity varies significantly in different organs. At week 3 after injection, the highest values were observed for the quadriceps femoris muscle, 4.7–9.7 times higher than those in other organs. It was also found that in the brain and lungs, promoter activity decreased 4.7-fold ($p=0.0094$) and 5.2-fold ($p=0.0039$), respectively, from 3 to 12 weeks after injection, while in other tissues no significant changes in activity were observed.

CONCLUSIONS. The CAG promoter is poorly suited for transgene expression in the lung and brain cells due to promoter silencing and is suboptimal for expression in the liver cells because of relatively low activity; these findings should be taken into account in the development of gene therapy products.

Keywords: gene therapy; recombinant adeno-associated virus; rAAV; CAG promoter; spinal muscular atrophy

For citation: Anisimov R.L., Nikiforova N.V., Ivanov E.S., Ovsepyan A.A., Borzov A.A., Kazarov A.A. Tissue specificity and age-related dynamics of CAG promoter activity in rAAV-mediated gene therapy. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(2):159–170. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-159-170>

Funding. The work was funded by GENERIUM JSC.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Рекombинантные аденоассоциированные вирусы (recombinant adeno-associated viruses, rAAV) в настоящее время из высокотехнологичного инструмента превращаются в один из базовых методов генной терапии. В настоящее время зарегистрировано несколько препаратов на основе rAAV, применяемых для терапии орфанных заболеваний (семейная недостаточность липо-

протеинлипазы, наследственная дистрофия сетчатки, гемофилия В) [1]. rAAV считаются относительно малоиммуногенными [2, 3], инфицируют широкий спектр клеток [4] и относительно просты в производстве [5]. Геном rAAV существует в клетке хозяина в виде нереплицирующихся эписомов [6], поэтому применение rAAV для устойчивого терапевтического эффекта ограничено долгоживущими и медленно делящимися клет-

ками [7], а возможность системного введения лимитирована возникновением иммунного ответа [8].

Геном rAAV представляет собой экспрессионную кассету, включающую промотор, кодирующую последовательность и сайт полиаденилирования, фланкированную инвертированными повторами (inverted terminal repeats, ITR). Промоторы условно разделяют на тканеспецифичные (например, производные промотора мышечной креатинкиназы, широко используемые в конструкциях для генной терапии наследственных заболеваний мышц [9]) и промоторы широкого спектра, позволяющие экспрессировать трансген в клетках практически любых тканей (например, промоторы PGK, CMV, EF1a) [10]. Одними из самых популярных промоторов в клинических исследованиях являются укороченные производные искусственного CAG-промотора, состоящего из раннего энхансера цитомегаловируса, промотора, первого интрона и экзона β -актина курицы, а также акцептора сплайсинга β -глобина кролика [11]. Поскольку исходный промотор имеет очень большие размеры (около 1,7 тыс. п.н.), обычно используются его укороченные варианты, в которых неизменной остается только коровая часть промотора β -актина. Эти производные обозначаются в литературе как «CAG» [12–15], «CBA» (chicken beta actin) [16] и «CB» [17]. Такой промотор, состоящий из промотора β -актина курицы, энхансера цитомегаловируса и модифицированного позднего 16S интрона вируса SV40, используется, например, в экспрессионной конструкции препарата Золгенсма (онасемноген абепарвовек, Novartis), применяемого для терапии спинальной мышечной атрофии [18].

Однако в действительности широкая специфичность промоторов не абсолютна, их активность сильно зависит от видовой принадлежности и типа клеток [19]. Например, промотор CMV, часто используемый для экспрессии трансгена в клетках HEK293 и CHO, имеет низкую активность в В-лимфоцитах [20] и практически полностью инактивируется в эмбриональных стволовых клетках мыши [21]. Кроме того, активность промоторов в разных тканях может по-разному изменяться со временем из-за влияния эпигенетических факторов (CpG-метилование, модификация гистонов) [22–24].

Эти особенности промоторов необходимо учитывать при разработке генетической конструкции генотерапевтических препаратов, так как обеспечение достаточного уровня экспрессии трансгена в целевой ткани в течение долгого времени определяет эффективность,

безопасность и стоимость препарата. Однако, несмотря на объективную необходимость оценки активности промоторов и ее динамики в различных органах и тканях, имеющиеся данные весьма ограничены.

Исследователи, тестирующие новые варианты rAAV или способы их введения, часто ограничиваются только определением уровня экспрессии репортерного гена (зеленый флуоресцентный белок (GFP), β -галактозидаза или хлорамфениколацетилтрансфераза) в целевых органах и клетках [16, 25–27]. Такой подход достаточен для целей исследований, но не дает информации об активности промотора, поскольку уровень экспрессии зависит также от эффективности вирусной трансдукции клеток органа.

Более информативен подход, рекомендуемый ведущими регуляторными органами (Европейское агентство по лекарственным средствам и Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США), в котором для оценки биораспределения вектора и экспрессии трансгена используется количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) и количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [28]. В таких исследованиях применяют нормализацию на единицу массы тотальной ДНК и РНК [28, 29]. Располагая данными о количестве вирусной ДНК и РНК трансгена в органах, можно оценить относительную активность промоторов, что позволяет прогнозировать результаты исследований с использованием тех же промоторов в экспрессионных кассетах rAAV. Однако при этом не учитывается, что количество РНК в клетках организма может варьировать более чем в 16 раз в зависимости от органа [30]. Соответственно, при теоретически одинаковой активности промотора для печени, где соотношение РНК:ДНК максимально среди органов, измеряемые значения активности будут занижены в 3 раза по сравнению с таковыми в сердце и в 8–9 раз — в легких. Таким образом, для корректного расчета относительной активности промотора в разных органах следует вводить поправочный коэффициент, отражающий относительное содержание РНК, то есть соотношение РНК:ДНК для каждого органа.

Цель работы — оценка относительной активности CAG-промотора и ее динамики в органах мышей в возрасте 3–12 недель.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сборка плазмид

Фланкированная ITR экспрессионная кассета (Последовательность 1, опубликована

в Приложении 1 на сайте журнала¹), содержащая последовательность гибридного CAG-промотора, оптимизированную для экспрессии в клетках млекопитающих кодирующую последовательность белка SMN (survival motor neuron) и сайт полиаденилирования SV40, была синтезирована в TOP Gene Technologies (Канада). В последовательности одного из ITR была делетирована область trs (терминальный сайт расщепления, terminal resolution site) для получения scrAAV (самокомплементарный рекомбинантный AAV, self-complementary recombinant AAV) [31]. Последовательность CAG-промотора была аналогична использовавшейся в оригинальном препарате (Золгенсма, Novartis) [18], с измененными сайтами клонирования между элементами промотора и добавленной канонической последовательностью Козак ACCGCCACCATG. Полученная последовательность была клонирована в вектор, производный от pUC, с геном устойчивости к канамицину для получения gAAV-плазмиды pAAV-CAG-SMN.

Плазмида pT7-SMN для наработки РНК SMN с помощью T7 РНК-полимеразы была создана путем замены последовательности энхансера цитомегаловируса и промотора β -актина курицы в плазмиде pAAV-CAG-SMN1 на последовательность T7 промотора TAATACGACTCACTATAGGG.

Получение и характеристика gAAV

Наработку вирусов проводили по традиционной методике [32] с использованием трех плазмид: pHelper (GenBank AF369965.1), pRep2Cap9 (кат. № 112865, Addgene) и pAAV-CAG-SMN, которыми в эквимоллярных соотношениях одновременно трансфицировали клетки HEK293. Вирусы выделяли из клеточного лизата с помощью последовательных хроматографических очисток на сорбентах POROS Capture Select AAV9 и POROS 50 HQ (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Полученный препарат анализировали на содержание остаточных белков хозяина (менее 10 нг/мл) и концентрировали до $2,0 \times 10^{13}$ вирусных геномов/мл в буфере готовой лекарственной формы (ГЛФ) (200 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 20 мМ трис(гидроксиметил)аминометана, 0,005% Poloxamer 188 (Pluronic F68), pH 8,0). Заполненность капсидов оценивали

методом аналитического ультрацентрифугирования ($\approx 97,2\%$). Целостность и самокомплементарность ДНК рекомбинантного вируса подтверждены методом щелочного электрофореза [33].

Экспериментальные животные

Мыши линии ICR CD-1 обоего пола были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» (Филиал ФГБУН «Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Пушкино, Московская обл.). Перед введением в исследование животные, из которых впоследствии формировались родительские пары, проходили адаптацию в течение 8 сут. Содержание и манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Международной конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей², а также Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях³. Протокол исследования рассмотрен и утвержден на заседании Комиссии по биоэтике АО «ГЕНЕРИУМ» (ветеринарный протокол № 64, версия 1 от 05.08.2022).

Дизайн исследования

Для изучения активности CAG-промотора в органах использовались новорожденные 2-дневные мыши линии CD-1 ($n=20$) в соответствии с утвержденной схемой исследования (рис. 1; раздел «Схема исследований», Приложение 1) и с учетом данных доклинических исследований оригинального препарата⁴. Работа с экспериментальными животными описана в разделе «Манипуляции с экспериментальными животными» Приложения 1.

Забор образцов тканей и выделение нуклеиновых кислот

Для выделения нуклеиновых кислот забирали по три образца тканей сердца, легких, печени, мозга и четырехглавой мышцы бедра (квадрицепса) массой 10 ± 2 мг, а также спинной мозг (целиком). Процедура детально описана в разделе «Забор образцов тканей и выделение нуклеиновых кислот» Приложения 1.

¹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-159-170-annex1>

² European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe; 1986.

³ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. European Parliament and Council; 2010.

⁴ Pharmacology/Toxicology Review for ZOLGENSMA. BLA NUMBER: 125694. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zolgensma>

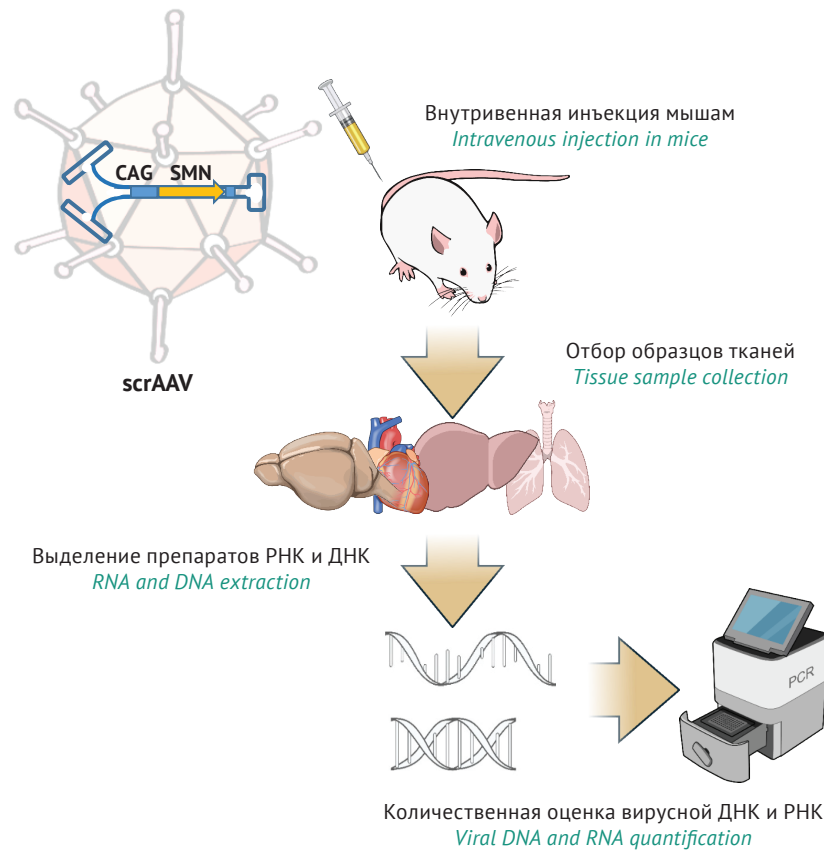


Рисунок подготовлен авторами с использованием ресурса NIH BIOART⁵ / The figure was prepared by the authors using the NIH BIOART Source⁵

Рис. 1. Схема исследования. scrAAV — самокомплементарный рекомбинантный AAV.

Fig. 1. Experimental design. scrAAV, self-complementary recombinant AAV.

Количественная оценка вирусной ДНК и мРНК в образцах тканей, расчет активности промотора

Оценка количества геномов rAAV в тканях была проведена методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием системы CFX96 Touch real-time PCR detection system (Bio-Rad, США). Условия проведения ПЦР-РВ приведены в разделе «Количественная оценка вирусной ДНК и мРНК в образцах тканей» Приложения 1 и *таблицах S1–S4* Приложения 1.

Относительную активность промотора рассчитывали как отношение числа транскриптов SMN в 25 нг total RNA к числу копий вирусных геномов в 50 нг total DNA для каждого образца, умноженное на коэффициент РНК:ДНК (*табл. S5*, Приложение 1). Данные о соотношении РНК:ДНК для головного мозга, печени, легких и сердца взяты из работы E.E. Schmidt и U. Schibler [30]; для спинного мозга использовались те же значения, что и для головного мозга. Для четырехглавой мышцы бедра использовали усредненные значения, полученные W.M. Fowler

с соавт. [34] для икроножной мышцы мышей в возрасте 4–13 нед. (*табл. S5*, Приложение 1).

Статистический анализ

Все процедуры статистического анализа выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.5 (GraphPad Software Inc., США). Распределение значений содержания векторной ДНК, мРНК-транскриптов SMN и относительной активности CAG-промотора статистически значимо отличалось от нормального и соответствовало лог-нормальному распределению (критерии Шапиро — Уилка и д'Агостино — Пирсона). В связи с этим для оценки математического ожидания и размаха данных использовали геометрическое среднее (GM) и геометрический коэффициент вариации (GCV, %) (*табл. S6–S8* опубликованы в Приложении 2 на сайте журнала⁶). Для оценки временной динамики содержания векторной ДНК и относительной активности промотора (после логарифмического преобразования по основанию 10 для приведения данных к нормальному

⁵ <https://bioart.niaid.nih.gov>

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-159-170-annex2>

распределению) применяли метод линейного регрессионного анализа. Для оценки средней скорости изменения показателей (Δ , % в нед.) использовали формулу (1):

$$\Delta = 100\% \times (10^k - 1), \quad (1)$$

где k — угловой коэффициент линейной зависимости логарифма показателя от времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика содержания вирусных геномов в органах

По количеству вирусных геномов в 50 нг тотальной ДНК, выделенной из образцов органов мышей в возрасте 3 нед., органы можно разделить на две категории: с условно низким содержанием (до 6000 копий) — головной мозг, спинной мозг и печень; с высоким содержанием (более 20000 копий) — легкие, сердце, четырехглавая мышца бедра (рис. 2; табл. S6 Приложение 2). Наименьшее содержание было отмечено в ДНК, выделенной из спинного мозга (1863 копии, GCV 102%), а наибольшее — в препарате из сердца (42365 копий, GCV 34%).

С течением времени содержание вирусных геномов изменялось неравномерно (табл. S9, Приложение 2). Так, в головном мозге и легких оно находилось примерно на одном уровне; в печени наблюдалось более чем двукратное снижение с 3 по 6 нед. с дальнейшим выходом на плато; для остальных органов происходило снижение в 2–3 раза с 3 по 12 нед., наиболее выраженное для препаратов из четырехглавой мышцы (с GM 23800 до 5609 копий, $p=0,0001$).

Для головного и спинного мозга отмечена наибольшая вариативность: содержание геномов gAAV для разных животных в одной временной точке могло различаться более чем на порядок.

Относительная активность CAG-промотора в органах и ее динамика

Активность промотора сильно различалась в органах. Наименьшая активность промотора у мышей в возрасте 3 нед. наблюдалась в головном мозге (11,85), а наибольшая — в четырехглавой мышце (115,33), в 4,7–9,7 раза превышающая активность в других органах (рис. 3; табл. S8, Приложение 2). В головном мозге также отмечена наибольшая вариативность (GCV 348%). Активность промотора для части проб менялась со временем как в сторону увеличения, так и уменьшения (табл. S10, Приложение 2). По этому признаку органы можно разделить на две условные группы: в одной активность промотора с 3 по 12 нед. значительно снижалась в несколько раз (головной мозг $p=0,0094$; легкие $p=0,0039$), в другой оставалась приблизительно постоянной (печень, сердце) или умеренно повышалась (спинной мозг $p>0,05$; четырехглавая мышца $p=0,0226$). Так, активность промотора в головном мозге снизилась в 4,7 раза (с 11,85 до 2,52), в то время как в четырехглавой мышце бедра увеличилась на 68% (со 115,33 до 194,24).

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании использовался gAAV, аналогичный таковому в оригинальном препарате (Золгенсма), предназначенном

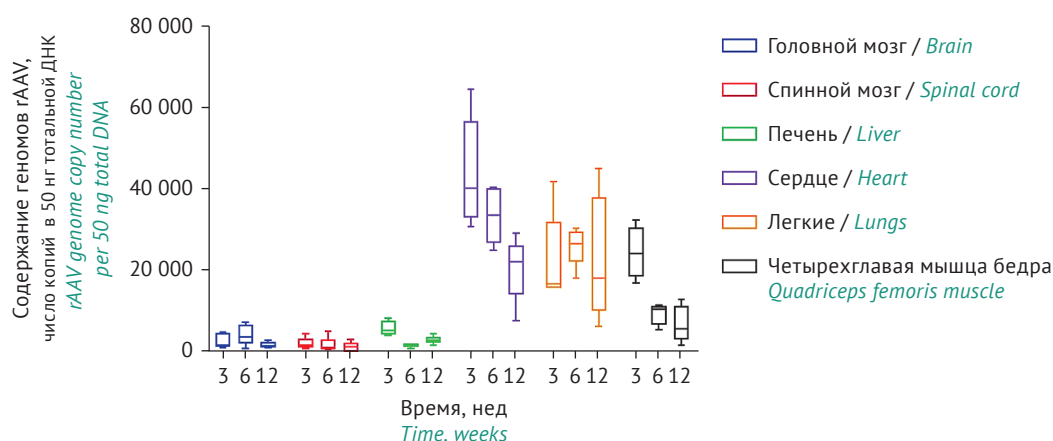


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Число копий геномов gAAV в 50 нг тотальной ДНК органов мышей.

Fig. 2. gAAV genome copy number in 50 ng of total DNA from mouse organs.

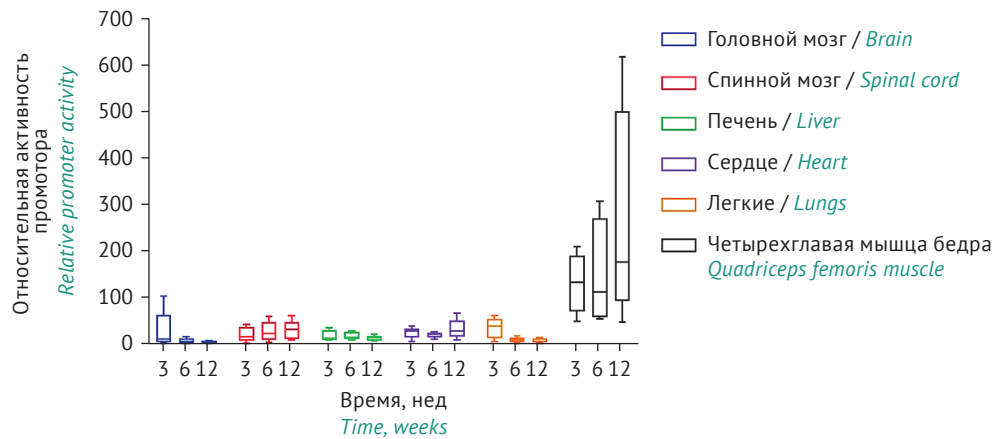


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Относительная активность CAG-промотора в органах мышей.

Fig. 3. Relative activity of the CAG promoter in mouse organs.

для лечения спинальной мышечной атрофии. При этом заболевании из-за мутаций в гене *SMN1* происходит дегенерация двигательных нейронов спинного мозга в постнатальный период [35]. Предполагается, что оригинальный препарат, представляющий собой rAAV9, содержащий кассету для экспрессии SMN, восполняет мутированный ген. Однако в клинических испытаниях вводимый внутривенно препарат показал низкую эффективность [36, 37]. Предположительно, одной из причин является неудачный выбор промотора экспрессионной кассеты и способа введения, приводящие к повышенной вирусной нагрузке в нецелевых органах и низкой экспрессии в целевых. В представленном исследовании проведена оценка возможности применения CAG-промотора для экспрессии трансгена в различных органах и тканях.

Результаты исследования динамики содержания rAAV и активности CAG-промотора в органах мышей

Головной и спинной мозг. Серотип AAV9 часто используется для генной терапии благодаря способности проникать через гематоэнцефалический барьер и заражать клетки центральной нервной системы [26, 38, 39], но он так же эффективно трансдуцирует клетки тканей других органов, в частности сердца, печени и скелетных мышц [40, 41]. Из полученных нами данных следует, что головной и спинной мозг не являются предпочтительной целью для rAAV9 у новорожденных мышей.

Среднее содержание геномов rAAV (GM) в головном мозге оставалось постоянным в течение всего эксперимента и снижалось примерно

вдвое в образцах спинного мозга. Это можно объяснить тем, что объем головного мозга мышей, а соответственно, и количество клеток после 3-недельного возраста увеличивается приблизительно лишь на 10% [42], объем же других органов, в том числе спинного мозга, увеличивается пропорционально массе тела мышей, которая в течение эксперимента возросла в 1,5–2 раза.

Средняя активность CAG-промотора в головном и спинном мозге у мышей 3-недельного возраста находилась на самом низком уровне среди образцов проанализированных органов. В дальнейшем активность CAG-промотора в головном мозге уменьшалась в 4,7 раза, что, возможно, связано с изменением профиля метилирования ДНК в первые 4 нед. жизни [43, 44], которое теоретически способно вызывать наблюдаемое снижение активности промотора.

Для головного и спинного мозга, несмотря на общность происхождения и непосредственную связь, отмечена резко различающаяся динамика активности CAG-промотора: в спинном мозге измеряемая активность не только не уменьшалась, но даже увеличилась на 67%. Предположительно, разница в динамике активности обусловлена различным клеточным составом органа. Известно, что AAV9 способен инфицировать как нейроны, так и глиальные клетки [39], общие для обоих органов. Однако отбираемые образцы спинного мозга также содержали фибробласты и эндотелиоциты мягкой оболочки спинного мозга (*pia mater*) [45], которые являются значительно более доступной мишенью для AAV9, поскольку именно *pia mater* представляет собой основной барьер

для проникновения AAV в паренхиму спинного мозга [46]. Поэтому, возможно, ассоциация относительно высокого уровня трансдукции клеток спинного мозга gAAV9 и последующей экспрессии трансгена, наблюдаемой во многих исследованиях [26, 47], только с нейронами несостоятельна. Преимущественная трансдукция ненейронных клеток могла бы объяснить низкую эффективность оригинального препарата.

Печень. Ранее была отмечена высокая гепатотоксичность оригинального препарата Золгенсма, предположительно из-за иммунного ответа на вирусные капсиды [48]. Однако в нашем исследовании вирусная нагрузка клеток печени оказалась значительно ниже, чем в мышцах и легких, и сравнима с таковой в клетках ЦНС. Скорее всего, наблюдаемое нами низкое содержание вирусных геномов связано с выбранным способом введения (в лицевую вену), который не предполагает первоначальной фильтрации в печени, в отличие от традиционной инъекции в периферические вены (конечностей и хвоста), при которых наибольшее содержание вирусных геномов обнаруживается именно в печени, как, например, в работе S.A. Khan с соавт. [49].

Кроме того, относительно постоянная активность CAG-промотора в печени у мышей 3-недельного возраста лишь незначительно превышает таковую в головном мозге. Таким образом, CAG-промотор не является оптимальным для экспрессии трансгена в клетках печени из-за относительно низкой активности. Подбор более эффективного промотора позволит существенно снизить вирусную нагрузку на орган при генной терапии, направленной на печень.

Легкие. Легкие, так же как сердце и скелетные мышцы, являются преимущественной мишенью AAV9: относительное содержание ДНК gAAV в этих органах было значительно выше, чем в других исследованных органах. Количество вирусных геномов в легочной ткани варьировало в широких пределах у экспериментальных животных, но среднее содержание с 3 по 12 нед. менялось незначительно (табл. S6, Приложение 2). Однако, как и в случае головного мозга, наблюдалось снижение активности промотора с 3 по 6 нед. почти в 5 раз, с последующей стабилизацией на приблизительно постоянном уровне. Возможно, это связано с тем, что в легких к концу 3 нед. завершается активная стадия альвеоляризации и начинается формирование взрослой структуры [50, 51]. Этот процесс сопровождается увеличением метилирования ДНК, приводящим к изменению экспрессии ряда генов, связанных с развитием легких [52, 53].

Возможно, при этом также метилируется CAG-промотор, что и вызывает резкое снижение его активности с 3 по 6 нед.

Сердце и четырехглавая мышца бедра. Среди проанализированных тканей именно в квадрицепсе CAG-промотор наиболее активен, продуцируя к 12 нед. в 16 и 77 раз больше транскриптов, чем в печени или головном мозге соответственно. При отсутствии мышечно-специфических промоторов, основанных на промоторах генов креатинкиназы или десмина [9], или невозможности их использования CAG-промотор может обеспечить высокий уровень экспрессии трансгена в мышечной ткани.

Считается, что мышечная ткань является подходящей мишенью для gAAV благодаря стабильности: средний возраст миоцитов человека составляет около 15 лет [54]. Соответственно, снижение содержания существующих в виде эпизода вирусных геномов из-за деления клеток происходит очень медленно, что обеспечивает большую устойчивость (durability) экспрессии трансгена [7]. Однако нами было обнаружено значительное снижение содержания геномов gAAV в образцах квадрицепса (в 4 раза) и сердца (в 2 раза) с 3 по 12 нед. после инъекции при увеличивающемся уровне экспрессии на 68 и 29% соответственно. Полученные результаты противоречат ранее опубликованным заключениям Z. Wang с соавт. [55] о стабильном числе копий вирусного генома в мышцах. Однако следует отметить, что в упомянутой работе не приведено сведений о динамике и представлены данные по биораспределению только для одной временной точки (2 месяца после введения вируса). Возможно, наблюдаемая нами потеря геномов gAAV имеет место только в мышечных волокнах и кардиомиоцитах в стадии гипертрофии; с возрастом число вирусных геномов в этих тканях стабилизируется. В пользу этого говорит замедление снижения среднего содержания геномов gAAV с возрастом животного: изменение, которое происходит с 6 по 12 нед., сопоставимо с периодом с 3 по 6 нед.

Наблюдаемое снижение содержания геномов gAAV не может быть объяснено процессами деления мышечной ткани. Известно, что период созревания мышечных волокон, сопровождающийся увеличением числа ядер в миофибрилле, завершается к 3 нед., а дальнейший рост мышечного волокна происходит только за счет гипертрофии [56]. В сердечной мышце в экспериментальный период стадия активного деления кардиомиоцитов (1–15 сут жизни) уже завершилась, и происходит плавное увеличение размеров сердечной мышцы за счет гипертрофии

кардиомиоцитов, коррелирующее с увеличением массы тела [57]. Возрастное увеличение площади в 3-недельном возрасте [58, 59] также слишком незначительно, чтобы обеспечить наблюдаемое снижение.

Увеличение активности CAG-промотора в мышечной ткани также труднообъяснимо. Как указано выше, стадии активных изменений в мышцах и сердце в экспериментальный период завершились, и логично было бы ожидать стабильного уровня экспрессии. Единственное значительное изменение, происходящее в скелетных мышцах, — появление специализации мышечных волокон, выражающееся в разделении их на окислительные («медленные») и гликолитические («быстрые»), начинающееся как минимум с 2-недельного возраста [60]. Возможно, увеличение активности CAG-промотора может быть связано с этим процессом.

Еще одним объяснением как снижения измеряемого числа вирусных геномов, так и роста измеряемой активности CAG-промотора в мышцах может быть присутствие в мышечной ткани транскрипционно неактивных вирусных частиц после инъекции. Известно, что в иммунопривитых тканях интактные вирусные частицы могут обнаруживаться в течение как минимум 6 лет [61]. В прочих тканях срок жизни вирусных частиц намного меньше, так как воспалительная реакция в ответ на присутствие вирусных капсидов разных серотипов полностью завершается у взрослых мышей уже в течение 72 ч [62]. Иммунная система новорожденных мышей отличается от таковой у взрослых [63], и, возможно, элиминация вирусных частиц в мышечной ткани происходит медленнее. Если вирусные частицы присутствуют в мышечной ткани в количествах, сравнимых с количеством трансдуцированных вирусных геномов или превышающих его, их элиминация ведет к увеличению измеряемой активности промотора даже при снижении относительного содержания РНК транскриптов (табл. S7, Приложение 2).

Экстраполяция полученных данных на другие варианты CAG-промоторов

Предположительно, полученные данные о динамике активности можно распространить на другие варианты CAG/CBA/CB-промоторов, отличающиеся размерами энхансера и 5'-нетранслируемыми областями (5'UTR). Ранее было показано, что, несмотря на общий основной элемент (промотор β -актина курицы) и наличие энхансера CMV, в прямом сравнении такие конструкции могут демонстрировать разный уровень экспрессии целевого белка [16, 64]. Однако можно ожидать,

что динамика изменения активности этих промоторов и их относительная органоспецифичность будут схожи, так как активность промоторов и изменения экспрессии, вызываемые эпигенетическими факторами, в значительной мере определяются именно промоторами и энхансерами [65], в то время как 5'UTR регулируют трансляцию и стабильность мРНК [66]. В подтверждение этого предположения можно привести работу I.T. Garza с соавт. [67], в которой при использовании промотора CBh [16] отмечалось аналогичное снижение уровня экспрессии трансгена в головном мозге мышей с течением времени.

Ограничения исследования и перспективы будущих исследований

Приведенные в данной работе значения относительной активности промоторов получены на основании ранее опубликованных данных о соотношении РНК:ДНК в различных органах мышей. Следует заметить, что информации по этому вопросу крайне мало: имеются данные только по ограниченному списку органов, как правило, для одной возрастной группы животных. Это вносит неточность в определение активности промоторов, так как количество и состав РНК в клетке непостоянны и в отдельных описанных случаях способны изменяться даже в течение суток [68]. Определение соотношения РНК:ДНК в анализируемых органах могло бы повысить достоверность получаемых значений активности промоторов.

Также представляет интерес проверка предположения о связи замалчивания CAG-промотора в головном мозге и легких мышей с его метилированием. В случае обнаружения сайтов метилирования их мутагенез мог бы потенциально отменить замалчивание промотора, повысив устойчивость экспрессии в этих органах.

ВЫВОДЫ

1. Предложена и апробирована методика расчета относительной активности промоторов в образцах тканей. Обнаружено, что CAG-промотор не обеспечивает высокой и стабильной экспрессии трансгена в головном мозге, легких и печени. Напротив, в скелетных мышцах (квадрицепс) CAG-промотор демонстрирует высокую активность, что делает его перспективным для мышечно-ориентированной терапии.
2. Наблюдаемое снижение активности CAG-промотора в головном мозге и легких с 3 по 12 нед. после инъекции коррелирует с описанным в литературе возрастным изменением профиля метилирования ДНК в органах мышей. Предположительно, эти процессы взаимосвязаны.

Литература/References

- Wang J-H, Gessler DJ, Zhan W, et al. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):78. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01780-w>
- Arjomandnejad M, Dasgupta I, Flotte TR, Keeler AM. Immunogenicity of recombinant adeno-associated virus (AAV) vectors for gene transfer. *BioDrugs*. 2023;37(3):311–29. <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00585-7>
- Dhungel BP, Winburn I, Pereira CDF, et al. Understanding AAV vector immunogenicity: From particle to patient. *Theranostics*. 2024;14(3):1260–88. <https://doi.org/10.7150/thno.89380>
- Choi V, McCarty D, Samulski R. AAV hybrid serotypes: Improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther*. 2005;5(3):299–310. <https://doi.org/10.2174/1566523054064968>
- Chen H. Adeno-associated virus vectors for human gene therapy. *World J Med Genet*. 2015;5(3):28–45. <https://doi.org/10.5496/wjmg.v5.i3.28>
- Penaud-Budloo M, Le Guiner C, Nowrouzi A, et al. Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol*. 2008;82(16):7875–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.00649-08>
- Muhuri M, Levy DI, Schulz M, et al. Durability of transgene expression after rAAV gene therapy. *Mol Ther*. 2022;30(4):1364–80. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.03.004>
- Vandamme C, Adjali O, Mingozzi F. Unraveling the complex story of immune responses to aav vectors trial after trial. *Hum Gene Ther*. 2017;28(11):1061–74. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.150>
- Skopenkova VV, Egorova TV, Bardina MV. Muscle-specific promoters for gene therapy. *Acta Naturae*. 2021;13(1):47–58. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11063>
- Artemyev V, Gubaeva A, Paremskaia AI, et al. Synthetic promoters in gene therapy: Design approaches, features and applications. *Cells*. 2024;13(23):1963. <https://doi.org/10.3390/cells13231963>
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*. 1991;108(2):193–9. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90434-d](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90434-d)
- O'Connor DM, Lutowski C, Jarrold MF, et al. Lot-to-lot variation in adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) preparations. *Hum Gene Ther Methods*. 2019;30(6):214–25. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2019.105>
- Orbán TI, Apáti Á, Németh A, et al. Applying a “double-feature” promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. *Stem Cells*. 2009;27(5):1077–87. <https://doi.org/10.1002/stem.45>
- Chai S, Wakefield L, Norgard M, et al. Strong ubiquitous micro-promoters for recombinant adeno-associated viral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023;29:504–12. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2023.05.013>
- Fagoe ND, Eggers R, Verhaagen J, Mason MRJ. A compact dual promoter adeno-associated viral vector for efficient delivery of two genes to dorsal root ganglion neurons. *Gene Ther*. 2014;21(3):242–52. <https://doi.org/10.1038/gt.2013.71>
- Gray SJ, Foti SB, Schwartz JW, et al. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Hum Gene Ther*. 2011;22(9):1143–53. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.245>
- Maguire CA, Ramirez SH, Merkel SF, et al. Gene therapy for the nervous system: Challenges and new strategies. *Neurotherapeutics*. 2014;11(4):817–39. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0299-5>
- Kaspar BK, Hatfield JM, Balleydier J, et al. Means and method for producing and purifying viral vectors. US Patent No. 12168777B2; 2024.
- Qin JY, Zhang L, Clift KL, et al. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One*. 2010;5(5):e10611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010611>
- Cayer M-P, Drouin M, Sea S-P, et al. Comparison of promoter activities for efficient expression into human B cells and haematopoietic progenitors with adenovirus Ad5/F35. *J Immunol Methods*. 2007;322(1–2):118–27. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.02.008>
- Chung S, Andersson T, Sonntag K, et al. Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2002;20(2):139–45. <https://doi.org/10.1634/stemcells.20-2-139>
- Levine A, Cantoni GL, Razin A. Inhibition of promoter activity by methylation: Possible involvement of protein mediators. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(15):6515–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.15.6515>
- Rosenqvist N, Hård Af Segerstad C, Samuelsson C, et al. Activation of silenced transgene expression in neural precursor cell lines by inhibitors of histone deacetylation. *J Gene Med*. 2002;4(3):248–57. <https://doi.org/10.1002/jgm.268>
- Zhang F, Frost AR, Blundell MP, et al. A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors. *Mol Ther*. 2010;18(9):1640–9. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.132>
- Schuster DJ, Dykstra JA, Riedl MS, et al. Biodistribution of adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) vector after intrathecal and intravenous delivery in mouse. *Front Neuroanat*. 2014;8:42. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00042>
- Dayton RD, Wang DB, Klein RL. The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(6):757–66. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.681463>
- Mohan RR, Schultz GS, Hong J-W, et al. Gene transfer into rabbit keratocytes using AAV and lipid-mediated plasmid DNA vectors with a lamellar flap for stromal access. *Exp Eye Res*. 2003;76(3):373–83. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(02\)00275-0](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(02)00275-0)
- Ma H, Bell KN, Loker RN. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020;20:152–68. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>
- Bustin S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25(2):169–93. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- Schmidt EE, Schibler U. Cell size regulation, a mechanism that controls cellular RNA accumulation: Consequences on regulation of the ubiquitous transcription factors Oct1 and NF-Y and the liver-enriched transcription factor DBP. *J Cell Biol*. 1995;128(4):467–83. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.4.467>
- McCarty DM, Fu H, Monahan PE, et al. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther*. 2003;10(26):2112–8. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302134>
- Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol*. 1998;72(3):2224–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.3.2224-2232.1998>

33. Xu J, DeVries SH, Zhu Y. Quantification of adeno-associated virus with safe nucleic acid dyes. *Hum Gene Ther*. 2020; 31(19–20):1086–99. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.063>
34. Fowler WM, Taylor RG, Franti CE, Hagler AN. The effect of age on the nucleic acid content of slow- and fast-twitch muscle in normal and dystrophic mice and their litter mates. *J Neurol Sci*. 1977;32(2):227–41. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(77\)90238-6](https://doi.org/10.1016/0022-510x(77)90238-6)
35. Keinath MC, Prior DE, Prior TW. Spinal muscular atrophy: Mutations, testing, and clinical relevance. *Appl Clin Genet*. 2021;14:11–25. <https://doi.org/10.2147/TACG.S239603>
36. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *N Engl J Med*. 2017;377(18):1713–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706198>
37. Rhee J, Kang J, Jo Y, et al. Improved therapeutic approach for spinal muscular atrophy via ubiquitination-resistant survival motor neuron variant. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2024;15(4):1404–17. <https://doi.org/10.1002/jcsm.13486>
38. Cearley CN, Wolfe JH. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol Ther*. 2006;13(3):528–37. <https://doi.org/10.1016/j.yimthe.2005.11.015>
39. Gray SJ, Matagne V, Bachaboina L, et al. Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: A comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol Ther*. 2011;19(6):1058–69. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.72>
40. Miyake N, Miyake K, Yamamoto M, et al. Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single-stranded AAV vectors. *Brain Res*. 2011;1389:19–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.03.014>
41. Bevan AK, Duque S, Foust KD, et al. Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol Ther*. 2011;19(11):1971–80. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.157>
42. Hammelrath L, Škokić S, Khmelinskii A, et al. Morphological maturation of the mouse brain: An *in vivo* MRI and histology investigation. *Neuroimage*. 2016;125:144–52. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.10.009>
43. Cisternas CD, Cortes LR, Bruggeman EC, et al. Developmental changes and sex differences in DNA methylation and demethylation in hypothalamic regions of the mouse brain. *Epigenetics*. 2020;15(1–2):72–84. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1649528>
44. Lister R, Mukamel EA, Nery JR, et al. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*. 2013;341(6146):1237905. <https://doi.org/10.1126/science.1237905>
45. Ellis H. Anatomy of head injury. *Surg Oxf*. 2007;25:505–7. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2007.10.008>
46. Miyanohara A, Kamizato K, Juhas S, et al. Potent spinal parenchymal AAV9-mediated gene delivery by subpial injection in adult rats and pigs. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16046. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.46>
47. Duque S, Joussemet B, Riviere C, et al. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther*. 2009;17(7):1187–96. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.71>
48. Chand D, Mohr F, McMillan H, et al. Hepatotoxicity following administration of onasemnogene abeparvovec (AVXS-101) for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Hepatol*. 2021;74(3):560–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.001>
49. Khan SA, Álvarez JV, Nidhi FNU, et al. Evaluation of AAV vectors with tissue-specific or ubiquitous promoters in a mouse model of mucopolysaccharidosis type IVA. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2025;33(2):101447. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2025.101447>
50. Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M. Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(2):L246–54. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00296.2007>
51. Mund SI, Stampanoni M, Schittny JC. Developmental alveolarization of the mouse lung. *Dev Dyn*. 2008;237(8):2108–16. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21633>
52. Tawa R, Ono T, Kurishita A, et al. Changes of DNA methylation level during pre- and postnatal periods in mice. *Differentiation*. 1990;45(1):44–8. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1990.tb00455.x>
53. Cuna A, Halloran B, Faye-Petersen O, et al. Alterations in gene expression and DNA methylation during murine and human lung alveolar septation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;53(1):60–73. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-01600C>
54. Spalding KL, Bhardwaj RD, Buchholz BA, et al. Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell*. 2005;122(1):133–43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.028>
55. Wang Z, Zhu T, Qiao C, et al. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol*. 2005;23(3):321–8. <https://doi.org/10.1038/nbt1073>
56. White RB, Biérinx A-S, Gnocchi VF, Zammit PS. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev Biol*. 2010;10:21. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-21>
57. Leu M, Ehler E, Perriard J-C. Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anat Embryol (Berl)*. 2001;204(3):217–24. <https://doi.org/10.1007/s004290100206>
58. Swift SK, Purdy AL, Kolell ME, et al. Cardiomyocyte ploidy is dynamic during postnatal development and varies across genetic backgrounds. *Development*. 2023;150(7):dev201318. <https://doi.org/10.1242/dev.201318>
59. Borowik AK, Davidyan A, Peelor FF, et al. Skeletal muscle nuclei in mice are not post-mitotic. *Function (Oxf)*. 2022;4(1):zqac059. <https://doi.org/10.1093/function/zqac059>
60. Simon A, Djeddi S, Bournon P, et al. Transcriptomic characterization of postnatal muscle maturation. *Dis Model Mech*. 2025;18(2):DMM052098. <https://doi.org/10.1242/dmm.052098>
61. Stieger K, Schroeder J, Provost N, et al. Detection of intact rAAV particles up to 6 years after successful gene transfer in the retina of dogs and primates. *Mol Ther*. 2009;17(3):516–23. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.283>
62. Stone D, Liu Y, Li Z-Y, et al. Biodistribution and safety profile of recombinant adeno-associated virus serotype 6 vectors following intravenous delivery. *J Virol*. 2008;82(15):7711–5. <https://doi.org/10.1128/JVI.00542-08>
63. Munguía-Fuentes R, Yam-Puc JC, Silva-Sánchez A, et al. Immunization of newborn mice accelerates the architectural maturation of lymph nodes, but AID-dependent IgG responses are still delayed compared to the adult. *Front Immunol*. 2017;8:13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00013>
64. Massaro G, Geard AF, Nelvagal HR, et al. Comparison of different promoters to improve AAV vector-mediated gene therapy for neuronopathic Gaucher disease. *Hum Mol Genet*. 2024;33(17):1467–80. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddae081>
65. King AD, Huang K, Rubbi L, et al. Reversible regulation of promoter and enhancer histone landscape by DNA methylation in mouse embryonic stem cells. *Cell Rep*. 2016;17(1):289–302. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.083>
66. Ryzek N, Łyś A, Makałowska I. The functional meaning of 5'UTR in protein-coding genes. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3):2976. <https://doi.org/10.3390/ijms24032976>

67. Garza IT, Eller MM, Holmes SK, et al. Expression and distribution of rAAV9 intrathecally administered in juvenile to adolescent mice. *Gene Ther.* 2025;32(3):189–96. <https://doi.org/10.1038/s41434-024-00498-2>

68. Sinturel F, Gerber A, Mauvoisin D, et al. Diurnal oscillations in liver mass and cell size accompany ribosome assembly cycles. *Cell.* 2017;169(4):651–63.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.015>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликованы Приложения 1 и 2.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-159-170-annex1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-159-170-annex2>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Вклад распределен следующим образом: **Р.Л. Анисимов** — планирование работ, анализ результатов и литературы, написание и редактирование текста рукописи; **Н.В. Никифорова** — разработка и валидация методик, работа с препаратами нуклеиновых кислот; **Е.С. Иванов** — производство и анализ препарата scrAAV; **А.А. Овсепян** — разработка и валидация методик, работа с животными; **А.А. Борзов** — разработка и валидация методик, работа с животными; **А.А. Казаров** — статистическая обработка результатов, оформление иллюстраций.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования с использованием экспериментальных животных был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике АО «ГЕНЕРИУМ» (ветеринарный протокол № 64, версия 1 от 05.08.2022).

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

Supplementary information. Supplementary materials 1 and 2 are available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-159-170-annex1>

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-159-170-annex2>

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **R.L. Anisimov** planned the work, performed analysis of the results and literature, drafted and edited the manuscript. **N.V. Nikiforova** developed and validated methods, performed experiments with nucleic acid preparations. **E.S. Ivanov** produced and analyzed the scrAAV preparation. **A.A. Ovsepyan** and **A.A. Borzov** developed and validated methods, performed experiments on animals. **A.A. Kazarov** performed statistical analysis of the results and prepared the illustrations.

Ethics approval. The animal study protocol was approved by the Bioethics Committee of GENERIUM JSC (Veterinary Protocol No. 64, version 1, dated August 5, 2022).

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

Об авторах / Authors

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

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

Никифорова Наталья Владимировна / Natalya V. Nikiforova

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

Иванов Евгений Сергеевич / Evgeny S. Ivanov

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

Овсепян Армен Алексанович / Armen A. Ovsepyan

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0628-5513>

Борзов Антон Александрович / Anton A. Borzov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9199-8464>

Казаров Александр Александрович / Alexander A. Kazarov

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

Поступила 19.02.2026

После доработки 20.05.2026

Принята к публикации 19.06.2026

Received February 19, 2026

Revised May 20, 2026

Accepted June 19, 2026



Получение клонов-продуцентов фермента кислой альфа-глюкозидазы на основе клеток линии CHO-K1

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

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

✉ Тимонова Софья Сергеевна; Timonova@ibcgenerium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Разработка биофармацевтического препарата для ферментной заместительной терапии на основе рекомбинантной кислой α -1,4-глюкозидазы (α -глюкозидаза) является актуальной задачей, решение которой может позволить обеспечить пациентов с болезнью Помпе необходимым количеством препарата в Российской Федерации. В работе показан эффективный способ получения стабильного промышленного клона-продуцента на основе клеток линии CHO-K1, продуцирующего активную α -глюкозидазу.

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Суспензионную клеточную линию CHO-K1 (ECACC) культивировали в среде BalanCD Growth A. Трансфекцию клеток проводили электропорацией на системе MaxCyte (по протоколу CHO). Селекцию продуцентов проводили с использованием пуромицина (5 мкг/мл). Клонирование осуществляли с помощью системы дозирования клеток на основе микрофлюидной технологии (C.SIGHT). Моноклональность клеточных линий подтверждали с применением автоматизированной системы визуализации клеток (Cell Metric CLD). Концентрацию α -глюкозидазы в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа. Активность фермента измеряли колориметрически с субстратом 4-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид (pNP- α -D-Glc).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Проведен скрининг 1000 продуцентов, в результате которого отобраны 22 клеточные линии с продуктивностью 0,14–0,65 г/л. Лидерный продуцент α -глюкозидазы GAA-14 клонировали с последующим подтверждением моноклональности. Получена панель из 20 моноклональных линий. Удельная активность фермента и содержание остатков маннозо-6-фосфата (M6P) ($4,3 \pm 0,9$ ЕД/мг; $0,99 \pm 0,10$ моль M6P/моль белка соответственно) не отличались от референтного препарата. При изучении стабильности лидерного клона в течение 60 генераций показано сохранение ростовых характеристик: жизнеспособность $98,5 \pm 1,5\%$, время удвоения популяции $20,0 \pm 1,3$ ч, продуктивность 450 ± 20 мг/л при периодическом культивировании в течение 7 сут.

ВЫВОДЫ. Получена стабильная моноклональная клеточная линия-продуцента α -глюкозидазы на основе CHO-K1, обеспечивающая продукцию активного фермента 0,45 г/л на 7 сут. Полученный клон-продуцент пригоден для масштабирования и наработки субстанции для доклинических исследований.

Ключевые слова: клеточная линия CHO-K1; моноклональная клеточная линия; кислая α -глюкозидаза; лизосомальная кислая α -1,4-глюкозидаза; 4-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид; GAA; болезнь Помпе; гликогеноз II типа; рекомбинантные ферменты

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

Финансирование. Работа проводилась при финансировании АО «ГЕНЕРИУМ».

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

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

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

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

✉ Sofia S. Timonova; Timonova@ibcgenerium.ru

ABSTRACT

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

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

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

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

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

Keywords:

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

For citation:

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

Funding. The study was funded by GENERIUM JSC.

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

ВВЕДЕНИЕ

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

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

Разработка клеточных линий, продуцирующих активные лизосомальные ферменты, представляет собой высокотехнологичную задачу в области клеточной инженерии. Это связано с уникальными требованиями к посттрансляционной модификации, компартментализации, внутриклеточному транспорту, активности ферментов, их pH-зависимому протеолитическому процессингу и выбору системы экспрессии. Выбор системы экспрессии критичен для производства рекомбинантных лизосомальных гидролаз, поскольку необходимо обеспечить паттерн гликозилирования, соответствующий нативному человеческому белку. Клеточные линии млекопитающих, в частности CHO-K1, широко используются в биофармацевтике для получения различных белков, включая ферменты. Это обусловлено их ферментативным аппаратом, который обеспечивает посттрансляционную модификацию и присоединение метки – остатка маннозо-6-фосфата (M6P) к олигосахаридам белка [6, 7]. Получение активной α -глюкозидазы показано с использованием растительных клеточных линий: клеток риса (титр до 45 мг/л, удельная активность 3,092 Ед/мг [8]); трансгенных клеток риса (выход α -глюкозидазы – 37 мг/л [9]); клеток линии *Arabidopsis alg3*, дефицитной по α -1,3-маннозилтрансферазе (максимальный

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

Лизосомальные ферменты имеют уникальный паттерн посттрансляционного гликозилирования. Критически важные остатки M6P на терминальных участках N-связанных гликанов обеспечивают специфическое узнавание лизосомального фермента рецепторами и его последующий транспорт в лизосомы. Именно терминальные M6P-остатки фермента обуславливают рецепторно-опосредованный эндоцитоз препарата и его биологическую функцию в лизосоме [11]. Для повышения содержания M6P применяют различные стратегии, такие как: котрансфекция генов-модуляторов (например, коэкспрессия фосфотрансферазы GlcNAc-1-PT [12]); нокаут генов кислых фосфатаз Asp2 и Asp5; химическая конъюгация очищенного фермента с бис-маннозо-6-фосфатом [13]; сайт-селективное ферментативное M6P-гликановое ремоделирование с использованием эндогликозидаз Endo-A/Endo-F3 и синтетического оксазолитетрасахарида M6P [14].

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

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

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

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

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмида, кодирующая ген *GAA*

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

Условия культивирования клеток

Клеточную линию CHO-K1 культивировали в питательной среде BalanCD Growth A (FujiFilm, США), не содержащей компонентов животного происхождения, в CO₂-инкубаторе Climo-Shaker ISF1-XC (Kuhner, Германия) в спин-тьюбах TubeSpin (конические биореакторы) (TPP Techno Plastic Products AG, Швейцария) при 37 °C, 5% CO₂, влажности >75%, перемешивании со скоростью 200 об/мин (рабочий объем 10–20 мл).

Оценка жизнеспособности и подсчет клеток

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

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

Трансфекция клеток электропорацией

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

Селекция

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

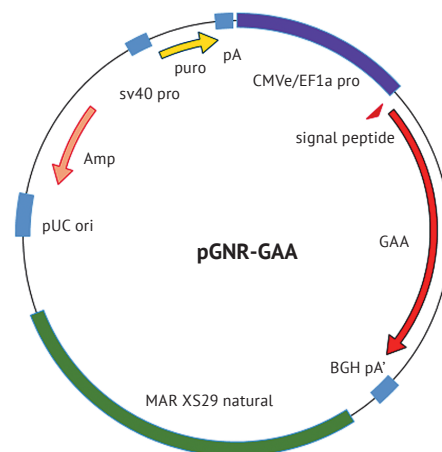


Рисунок подготовлен авторами / The figure was prepared by the authors

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

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

Инкубацию проводили в стационарном режиме до формирования устойчивых продуцентов в течение 14 сут (частичная смена селективной среды каждые 5–6 сут) в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37 °C, 5% CO₂, влажности >75%.

Получение клонов-продуцентов α-глюкозидазы

Клеточную линию, продуцирующую фермент α-глюкозидазу, клонировали с применением системы дозирования единичных клеток C.SIGHT (CYTENA, Германия) в 96-луночные плоскодонные планшеты с использованием среды BalanCD Growth A и культивировали в стационарных условиях в течение 14 сут при 37 °C, 5% CO₂, влажности >75%. Моноклональность клеточных линий подтверждали с помощью автоматизированной системы визуализации (фотодокументации) клеток Cell Metric CLD (Solentim, Великобритания) путем сканирования всей площади лунки в день 0 (единичная клетка) и в последующие дни роста (мониторинг формирования колонии).

Криоконсервация

Клетки в экспоненциальной фазе роста (жизнеспособность >95%) осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин), удаляли супернатант, ресуспендировали осадок в криопротекторной смеси (ростовая среда с 10% диметилсульфоксидом) до концентрации 1,0×10⁷ клеток/ампула, разливали в стерильные криопробирки, медленно охлаждали (1 °C/мин) в контейнере Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific, США) до минус 80 °C в течение 24 ч, затем переносили в пары жидкого азота CryoExtra 20 (Thermo Scientific, США) для длительного хранения.

Иммуноферментный анализ

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

Культивирование продуцентов α-глюкозидазы

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

среды BalanCD Growth A с добавлением подкормки BalanCD CHO Feed 4 (IrvineScientific, США; 4% от объема культуры) в течение 7 сут в шейкере-инкубаторе Infors HT Multitron (INFORS HT, Швейцария) при 37 °C, 5% CO₂, влажности >75%, при перемешивании 150 об/мин. Посевная концентрация клеток составляла 0,3×10⁶ клеток/мл.

Очистка фермента α-глюкозидазы

Хроматографическую очистку α-глюкозидазы проводили с использованием препаративной системы AKTA Pure 25 (Cytiva, США). Для аффинного связывания целевого белка из культуральной жидкости (КЖ) использовали металл-хелатный сорбент IMAC 6FF (Cytiva, США), предварительно насыщенный ионами Cu²⁺. В ходе пробоподготовки в КЖ, содержащую целевой фермент, вносили раствор сульфата меди до конечной концентрации 1 мМ, доводили pH до 6,5 (0,3 М HCl или 0,5 М, NaOH), затем наносили КЖ на аффинный сорбент. После сорбции целевого фермента сорбент последовательно промывали фосфатными буферами с последовательным снижением ионной силы и pH: 25 мМ Na₂HPO₄, 175 мМ NaCl, pH 6,5 и 25 мМ Na₂HPO₄, 40 мМ NaCl, pH 6,0. Десорбцию α-глюкозидазы проводили промывкой сорбента буферным раствором (25 мМ Na₂HPO₄, 10 мМ имидазола, pH 6,0) для мягкой элюции и сохранения активности фермента. Содержание белка в элюате определяли спектрофотометрически (λ=280 нм); расчет проводили с использованием коэффициента экстинкции ε=1,51 мл/(мг×см).

Измерение активности фермента α-глюкозидазы

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

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

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

Измерение М6Р

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

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

Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Empower 3 (Waters)

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение продуцентов α -глюкозидазы

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

Лидерные продуценты переводили в спин-тьюбы для восстановления жизнеспособности и последующей криоконсервации. Далее осуществляли отбор продуцентов по ростовым показателям и продуктивности (рис. 3). В течение 7 сут проводили периодическое культивирование 22 продуцентов α -глюкозидазы, в ходе которого оценивали жизнеспособность клеточных линий (рис. S1А, опубликован в Приложении 1 на сайте журнала²), концентрацию жизнеспособных клеток (рис. S1В, Приложение 1), продуктивность (рис. S1А), удельную продуктивность (рис. S1С, Приложение 1) и активность фермента (рис. S1В). Жизнеспособность клеточных линий начала снижаться на 7 сут, после чего культивирование было остановлено. Максимальную концентрацию жизнеспособных клеток наблюдали на 6 сут: биомасса продуцентов GAA-21 и GAA-8 достигала пиковой плотности более 25×10^6 клеток/мл (рис. S1В, Приложение 1). Максимальную волюметрическую продуктивность ($>0,6$ г/л) выявили у продуцентов GAA-7,

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

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

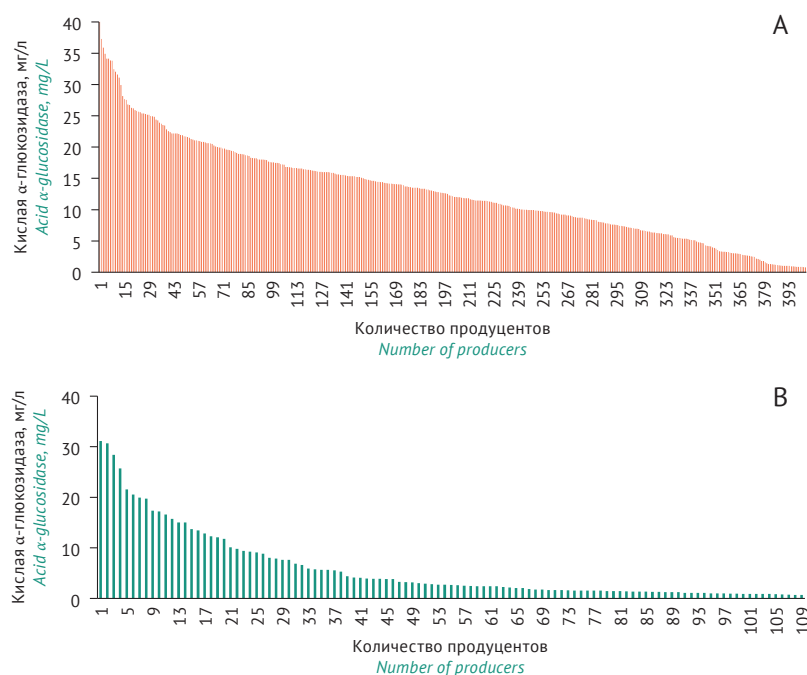


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

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

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

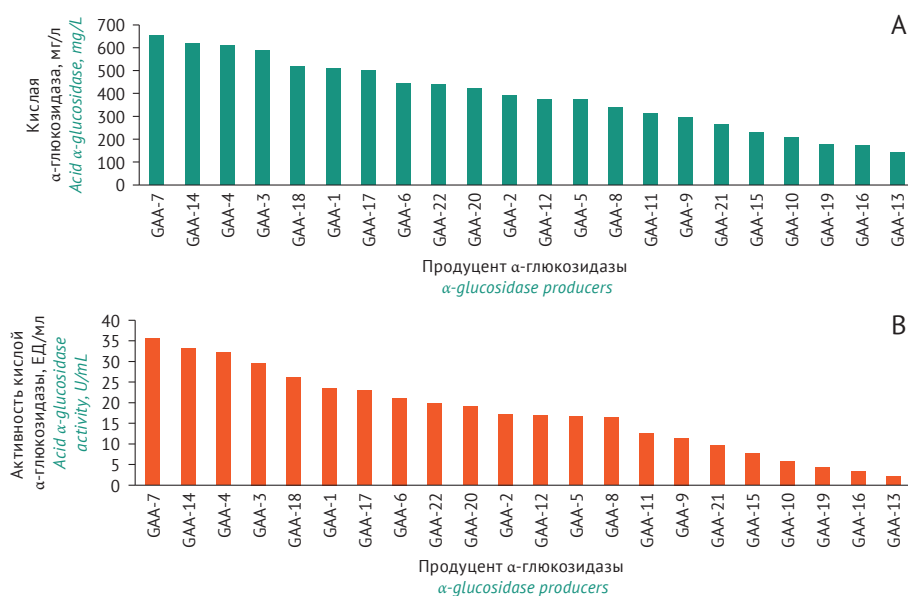


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

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

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

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

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

Получение моноклональных клеточных линий-продуцентов

Процедуру клонирования проводили в соответствии с принципами обеспечения моноклональности клеточных линий (FDA Q5D³), поскольку при производстве биофармацевтических продуктов использование моноклональной клеточной линии является ключевым фактором, гарантирующим постоянство, предсказуемое качество синтезируемых рекомбинантных белков и стабильность клеточных линий.

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

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

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

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

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

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

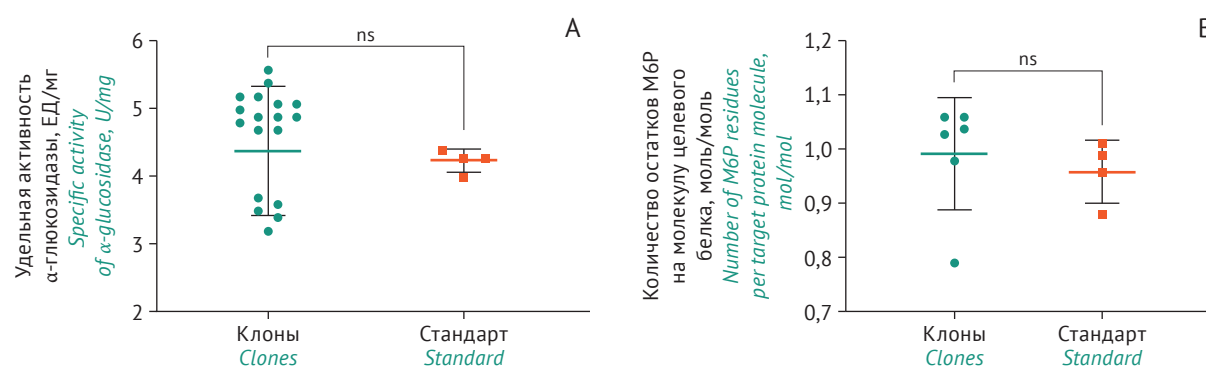


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

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

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

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

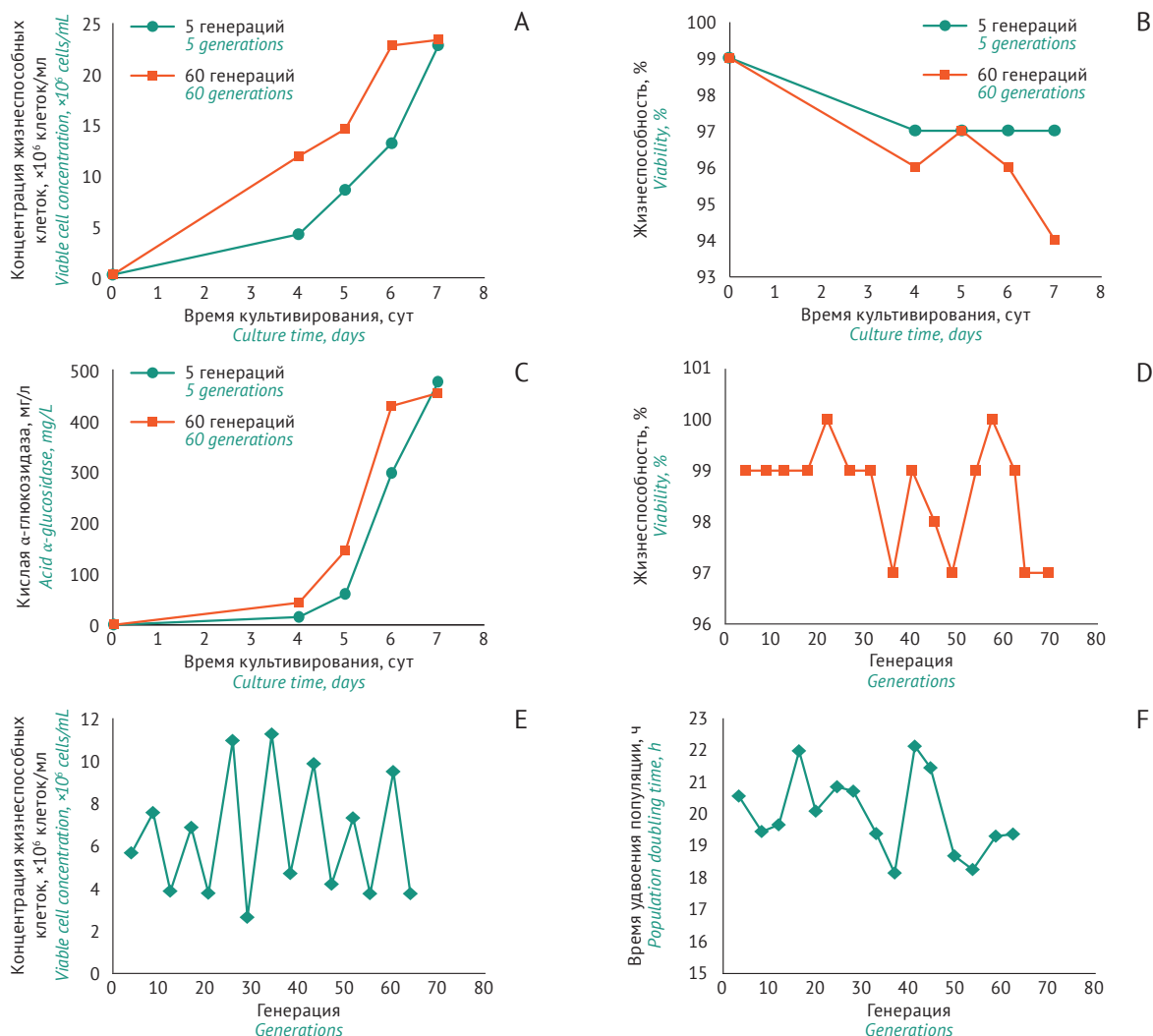


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

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

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

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

ОБСУЖДЕНИЕ

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

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

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

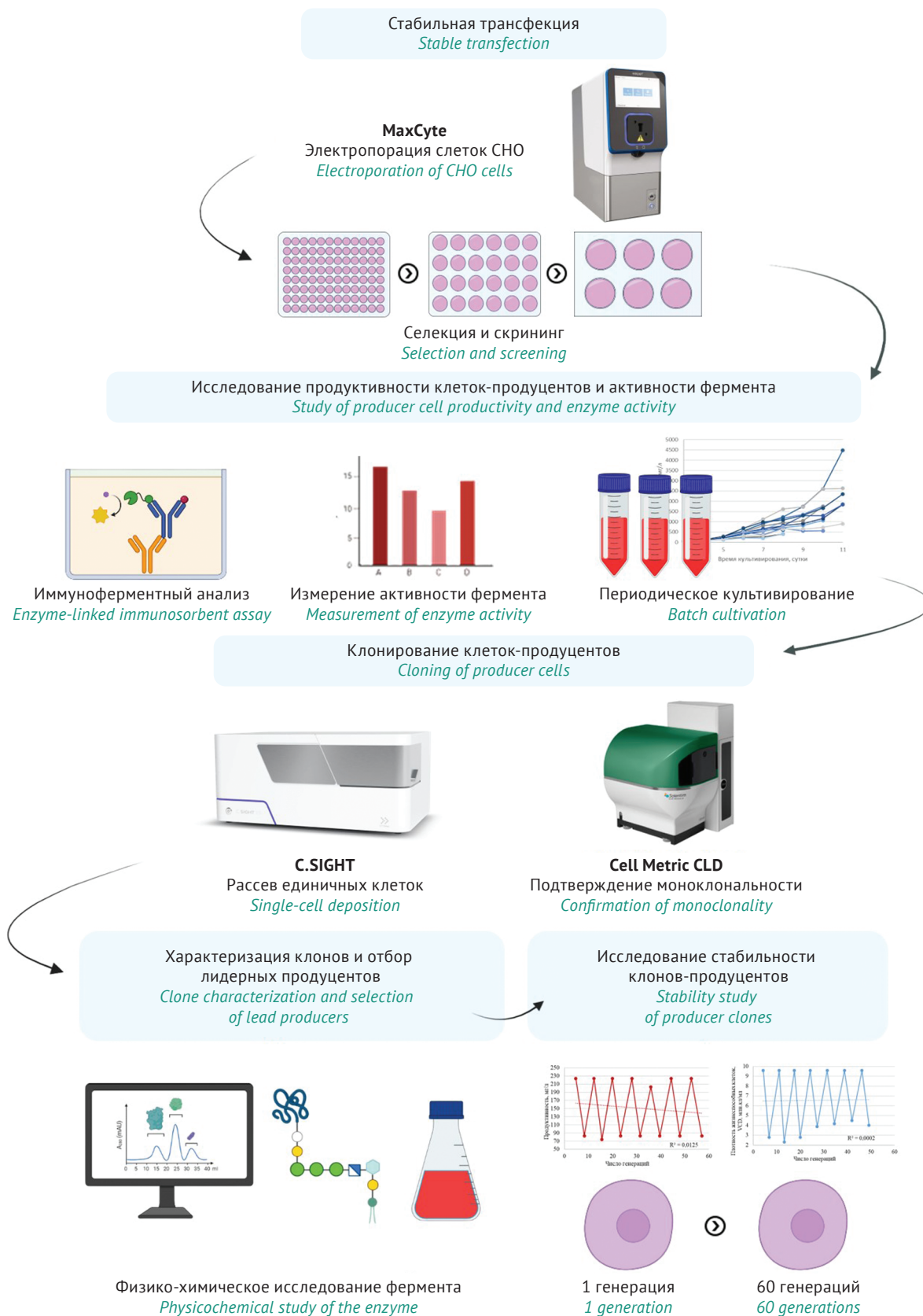


Рисунок подготовлен авторами с использованием шаблонов biorender.com / This figure was prepared by the authors using the templates from biorender.com

Рис. 6. Схема получения продуцентов α -глюкозидазы на основе клеток линии CHO-K1.

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

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

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

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

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

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

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

ВЫВОДЫ

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

Литература/References

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

4. Risi B, Caria F, Bertella E, et al. Management of Pompe disease alongside and beyond ERT: A narrative review. *Acta Myol.* 2025;44(1):11–22. <https://doi.org/10.36185/2532-1900-1106>
5. Chien YH, Chen HA, Hsu RH, et al. Efficacy of transitioning from alglucosidase alfa to avalglucosidase alfa in infantile-onset Pompe disease: A single-center cohort analysis. *Genet Med.* 2025;27(5):101373. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2025.101373>
6. Kishnani PS, Díaz-Manera J, Illarioshkin S, et al. Efficacy and safety of avalglucosidase alfa in patients with late-onset Pompe disease after 145 weeks of treatment during the COMET trial. *J Neurol.* 2025;272(9):581. <https://doi.org/10.1007/s00415-025-13266-y>
7. Le Bras A, De Lonlay P, Attarian S, et al. Medical expenses and care pathways of patients with Pompe receiving myozyme: an observational study based on the French national healthcare database. *Orphanet J Rare Dis.* 2025;20(1):554. <https://doi.org/10.1186/s13023-025-03866-2>
8. Jung JW, Huy NX, Kim HB, et al. Production of recombinant human acid α -glucosidase with high-mannose glycans in GtT1 rice for the treatment of Pompe disease. *J Biotechnol.* 2017;249:42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.033>
9. Jung JW, Kim NS, Jang SH, et al. Production and characterization of recombinant human acid α -glucosidase in transgenic rice cell suspension culture. *J Biotechnol.* 2016;226: 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.031>
10. Sariyatun R, Florence, Kajiura H, et al. Production of human acid-alpha glucosidase with a paucimannose structure by glycoengineered arabidopsis cell culture. *Front Plant Sci.* 2021;12:703020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.703020>
11. Bohnsack RN, Misra SK, Liu J, et al. Lysosomal enzyme binding to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor is regulated allosterically by insulin-like growth factor 2. *Sci Rep.* 2024;14(1):26875. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75300-9>
12. Liu L, Lee WS, Doray B, Kornfeld S. Engineering of GlcNAc-1-phosphotransferase for production of highly phosphorylated lysosomal enzymes for enzyme replacement therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;5:59–65. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.03.006>
13. Caval T, Zhu J, Tian W, et al. Targeted analysis of lysosomal directed proteins and their sites of mannose-6-phosphate modification. *Mol Cell Proteomics.* 2019;18(1):16–27. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000967>
14. Zhang X, Liu H, Meena N, et al. Chemoenzymatic glycan-selective remodelling of a therapeutic lysosomal enzyme with high-affinity M6P-glycan ligands. Enzyme substrate specificity is the name of the game. *Chem Sci.* 2021;12(37):12451–62. <https://doi.org/10.1039/d1sc03188k>
15. Steger K, Brady J, Wang W, et al. CHO-S antibody titers >1 gram/liter using flow electroporation-mediated transient gene expression followed by rapid migration to high-yield stable cell lines. *J Biomol Screen.* 2015;20(4):545–51. <https://doi.org/10.1177/1087057114563494>
16. Anumula KR. Quantitative determination of monosaccharides in glycoproteins by high-performance liquid chromatography with highly sensitive fluorescence detection. *Anal Biochem.* 1994;220(2):275–83. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1338>
17. Trivedi PC, Bartlett JJ, Puliniikunnil T. Lysosomal biology and function: Modern view of cellular debris bin. *Cells.* 2020;9(5):1131. <https://doi.org/10.3390/cells9051131>
18. Feng X, Liu S, Xu H. Not just protons: Chloride also activates lysosomal acidic hydrolases. *J Cell Biol.* 2023;222(6):e202305007. <https://doi.org/10.1083/jcb.202305007>
19. Neuss A, Steimann T, Tomas Borges JS, et al. Scale-up of CHO cell cultures: From 96-well-microtiter plates to stirred tank reactors across three orders of magnitude. *J Biol Eng.* 2025;19(1):5. <https://doi.org/10.1186/s13036-024-00475-8>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликовано Приложение 1.

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

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

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

Supplementary information. Supplementary material 1 is available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.*

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

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

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

Об авторах / Authors

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

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

Шубина Софья Сергеевна / **Sofia S. Shubina**

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

Снегирева Юлия Сергеевна / **Julia S. Snegireva**

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

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

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

Никифорова Наталья Владимировна / **Natalya V. Nikiforova**

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

Третьак Данила Алексеевич / **Daniila A. Tretyak**

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

Королева Мария Александровна / **Mariya A. Koroleva**

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

Неронова Мария Юрьевна / **Maria Yu. Neranova**

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

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

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

Поступила 19.02.2026

После доработки 22.05.2026

Принята к публикации 19.06.2026

Received February 19, 2026

Revised May 22, 2026

Accepted June 19, 2026



Применение метода детекции антителозависимого усиления инфекции *in vitro* на примере вируса Чикунгунья

Е.В. Отрашевская , Т.Г. Самарцева , А.С. Оксанич , С.С. Гогина ,
В.В. Зверев , Г.М. Игнатьев

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

✉ Игнатьев Георгий Михайлович; marburgman@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Механизм антителозависимого усиления инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE), опосредуемый через Fcγ-рецептор иммунных клеток, принято считать основным. Комплекс вируса со специфическим иммуноглобулином G (IgG) взаимодействует с данным рецептором, обеспечивая вирусу лучшее проникновение в клетку. Развитие ADE возможно и у вакцинированных, что предполагает его изучение при оценке безопасности разрабатываемых вакцин.

ЦЕЛЬ. Применение метода детекции антителозависимого усиления *in vitro* с использованием клеток линий K562 и Vero, а также штамма вируса Чикунгунья Nika21.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В исследовании использовали вирус Чикунгунья (ЧикВ) штамм Nika21 и сыворотки, содержащие специфические анти-ЧикВ IgG. Специфические сыворотки использовались в разных разведениях. Для оценки ADE клетки линий K562 и Vero заражали «смесью» ЧикВ со специфическими антителами (АТ). На четвертые сутки после заражения определяли биологический титр ЧикВ и содержание вирусной РНК. Титр ЧикВ определяли с помощью стандартного метода титрования вируса *in vitro*, а количество РНК — с помощью флуоресцентного метода ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Наличие ADE считали подтвержденным, если значения биологического титра ЧикВ в присутствии исследуемой сыворотки в данном разведении были >3 SD относительно среднего титра ЧикВ в контроле, который представлял собой «смесь» ЧикВ с сывороткой здорового добровольца.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В клетках линии Vero с помощью обоих методов было отмечено усиление репликации ЧикВ при увеличении разведения иммунных сывороток, которое, однако, не превышало значений титров ЧикВ в контроле. В клетках линии K562 исследуемые сыворотки в одном разведении продемонстрировали статистически достоверное усиление репликации ЧикВ относительно соответствующего контроля. Таким образом, в нашем исследовании ADE было обнаружено в присутствии промежуточных разведений иммунных сывороток с относительно средним или низким титром анти-ЧикВ АТ.

ВЫВОДЫ. Репликация ЧикВ в FcR-негативных клетках линии Vero подтвердила высокую чувствительность данной линии клеток к вирусу и возможность использования ее исключительно для оценки нейтрализующей активности специфических АТ. Клетки FcR-экспрессирующей линии K562 позволили анализировать обе функции АТ: и нейтрализующую вирус, и активирующую инфекцию. Результаты работы подтвердили возможность проведения исследований ADE *in vitro*, что значительно упрощает исследование феномена ADE при оценке безопасности разрабатываемых вакцин.

Ключевые слова: вирус Чикунгунья; антителозависимое усиление инфекции; *in vitro* анализ

Для цитирования: Отрашевская Е.В., Самарцева Т.Г., Оксанич А.С., Гогина С.С., Зверев В.В., Игнатьев Г.М. Применение метода детекции антителозависимого усиления инфекции *in vitro* на примере вируса Чикунгунья. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(2):183–195. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Г.М. Игнатьев — заместитель главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2024 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Application of an *in vitro* method for detecting antibody-dependent enhancement of Chikungunya virus infection

Elena V. Otrachevskaja , Tatyana G. Samartseva , Aleksey S. Oksanich ,
Sofya S. Gogina , Vitaly V. Zverev , George M. Ignatyev 

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064,
Russian Federation

✉ George M. Ignatyev; marburgman@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The mechanism of antibody-dependent enhancement (ADE) caused by the Fcγ receptor on immune cells is a key factor. When the virus binds to specific immunoglobulin G (IgG), it enhances cell penetration. ADE can also occur in vaccinated individuals, making its study crucial for evaluating vaccine safety.

AIM. This study aimed to apply the method of detection of antibody-dependent enhancement *in vitro* using cells of the K562 and Vero lines, as well as the Chikungunya virus strain Nika21.

MATERIALS AND METHODS. Chikungunya virus (ChikV) Nika21 strain and different dilutions sera containing anti-ChikV IgG were used. To evaluate ADE, K562 and Vero cells were challenged with a ChikV with specific IgG mixture. On the fourth day after infection, the biological ChikV titer and viral RNA content were determined. ChikV titer was determined by standard *in vitro* virus titration and RNA amount was determined by real-time fluorescence reverse transcription PCR. ADE was considered confirmed if the values of the biological ChikV titer in the presence of the tested serum were >3 SD relative to the mean ChikV titer in the control, which represented ChikV with serum of a healthy volunteer.

RESULTS. In Vero cells, both methods showed increased ChikV replication with an increase in the dilution of immune sera, which, however, did not exceed the values of ChikV titers in the control. In K562 cells, serum with anti-ChikV IgG in one dilution demonstrated statistically significant enhancement of ChikV replication relative to the corresponding control. Thus, in our study, ADE was detected in the presence of intermediate dilutions of immune sera with a relatively medium or low titer of anti-ChikV AT.

CONCLUSION. ChikV replication in FcR-negative Vero cell line confirmed the high sensitivity to the virus and the possibility of using it exclusively for assessing the neutralizing activity of specific IgG. FcR-expressing K562 cell line allowed to analyze both virus neutralizing and activating infection functions of IgG. Our results confirmed the possibility of conducting ADE studies *in vitro*, which greatly simplifies the study of the ADE phenomenon when assessing the safety of vaccines under development.

Keywords: Chikungunya virus; antibody-dependent enhancement of infection; *in vitro* analysis

For citation: Otrachevskaja E.V., Samartseva T.G., Oksanich A.S., Gogina S.S., Zverev V.V., Ignatyev G.M. Application of an *in vitro* method for detecting antibody-dependent enhancement of Chikungunya virus infection. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(2):183–195. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. George M. Ignatyev has been a Deputy Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2024. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Среди вирусов, которые могут вызывать антителозависимое усиление инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE), есть представители нескольких семейств *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Retroviridae*, *Pneumoviridae* [1–7], *Filoviridae* [8, 9]. Общепринято, что для ADE необходим «сенсibiliзирующий» первичный иммунный ответ, каковыми могут быть предшествующие инфекции гомологичными или близкородственными вирусами. ADE является комплексным феноменом, и то, как наличие предшествующих антител (АТ) влияет на течение вирусной инфекции, зависит от множества факторов, среди которых штамм вируса, доза заражения, взаимодействие между АТ и рецепторами клеток, комплементарным компонентом, а также стехиометрия «вирус–антитело», класс и специфичность АТ [2, 10]. Феномен ADE впервые был описан для арбовирусных инфекций в 1960-х годах [11], а детальное изучение феномена было начато S.B. Halsted с соавт. для инфекции, вызываемой вирусом денге (ДенВ) [1, 12]. В ранних исследованиях было продемонстрировано, что увеличение продукции вируса связано с взаимодействием иммунных комплексов и Fc-рецепторов (FcR) клетки [1, 13]. По мнению S.B. Halsted с соавт., именно этот механизм приводит к превращению легкого самоограниченного заболевания в синдром повышенной проницаемости сосудов, который, в свою очередь, является основным патофизиологическим механизмом развития геморрагической лихорадки / синдрома шока при инфекции, вызываемой ДенВ [14].

В настоящее время механизм ADE, опосредуемый через FcR на поверхности клеток, принято считать основным [2, 15–17], не исключая роль комплимента и других менее значимых факторов. Для взаимодействия с Fc-частью иммуноглобулина G (IgG) наиболее важным является Fcγ рецептор (FcγR) иммунных клеток [3, 15, 18, 19]. На поверхности клеток человека присутствуют три типа FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), на клетках мышей еще распознается и FcγRIV [17].

При вирусных инфекциях ADE имеет два основных пути, которые приводят к увеличению продукции вируса. Первый путь представляет собой усиленное поглощение вируса фагоцитарными клетками, что приводит к увеличению количества инфицированных клеток (extrinsic ADE). Второй путь представляет собой усиленное внутриклеточное размножение вируса в результате

модулирования эффекторных функций клетки и блокировки противовирусной защиты (intrinsic ADE) [14, 20, 21]. В обоих случаях, по мнению многих исследователей, FcγR является ключевым рецептором на поверхности клеток, включая макрофаги, эозинофилы, нейтрофилы, дендритные клетки, В-клетки и тучные клетки, который способствует усилению инфекции.

Феномен ADE при ДенВ достаточно давно изучается *in vitro* с применением линий клеток, экспрессирующих FcγR [22–25]. Так, например, линия клеток K562 является FcγRII-экспрессирующей и достаточно широко применяется для исследования феномена ADE не только при инфекции ДенВ, но и при инфекции вирусом Чикунгунья (ЧикВ) [26] и вирусом Зика [6]. Используемые для оценки нейтрализующих анти-ДенВ АТ клетки Vero (рекомендации Всемирной организации здравоохранения¹) не позволяют оценить эффекторные функции Fc, так как клетки линии Vero являются FcR-негативными. Это объясняет, почему использование только метода реакции нейтрализации недостаточно, чтобы определить, является ли иммунный ответ исключительно протективным [19]. Так, проведенные сравнительные исследования вируснейтрализующих анти-ДенВ АТ в сыворотке крови с применением FcR-негативных клеток линии Vero и FcR-экспрессирующих линий клеток демонстрируют существенную разницу в результатах [14, 27–29]. Исследования подтвердили специфичность феномена ADE для разного типа клеток и зависимости от генетики хозяина [13, 27]. Разработка методов оценки *in vitro* риска развития ADE подтвердила возможность проведения анализа у пациентов со вторичной ДенВ-инфекцией как по уровню инфицирования [23], по инфекционному титру [1, 22], так и по количеству инфекционных центров [23]. У вакцинированных риск развития ADE впервые был оценен при проведении клинических исследований тетравалентной вакцины против ДенВ. Анализ был проведен *in vitro* с использованием сывороток от вакцинированных по уровню инфицирования клеток линии K562 с помощью цитофлуориметрического метода [30].

Цель работы – применение метода детекции антителозависимого усиления *in vitro* с использованием клеток линий K562 и Vero, а также штамма вируса Чикунгунья Nika21.

В работе использовали охарактеризованные сыворотки пациентов, перенесших инфекцию ЧикВ. Титр ЧикВ определяли с помощью стандартного метода титрования вируса *in vitro*,

¹ <http://www.who.int/immunization/documents/date/en/index.html>

а количество РНК ЧикВ — с помощью флуоресцентного метода (ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени). Параллельно проводили сравнительное изучение репликации ЧикВ в клетках FcR-негативной линии Vero.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. В работе был использован штамм Nika21 (генотип ECSA), полученный из коллекции вирусов ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова». Нуклеотидная последовательность штамма Nika21 представлена в GenBank (OQ320495). Характеристики ЧикВ, используемого для экспериментов, представлены в *таблице S1* (онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала²). Все работы проводили с соблюдением действующих санитарных норм и правил³ и в соответствии с протоколом, одобренным локальным этическим комитетом ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» № 17/2025 от 25.11.2020.

Клетки. В экспериментах использовались клеточные линии Vero и K562. Клетки линии Vero получены из банка посевных клеток ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова». Клетки линии Vero использовали на уровне 145-го пассажа. Клетки линии K562 (хроническая миелогенная лейкемия человека) получены из банка клеток ООО «БиолоТ» (Россия). В качестве среды поддержки для клеток Vero использовали среду DMEM (ООО «БиолоТ») с 5% эмбриональной телячьей сывороткой — ЭТС (ООО «БиолоТ»). Для клеток линии K562 в качестве среды поддержки использовали RPMI 1640 с 10% ЭТС в соответствии с паспортом производителя (ООО «БиолоТ»).

Клетки линии K562 обладают слабыми адгезивными свойствами [23], и их обычно культивируют суспензионным способом, однако небольшая часть этих клеток проявляет полуадгезивные свойства. Нами была повторена ранее описанная процедура селективного пассирования полуадгезивных клеток K562 [23]. В дальнейшем при проведении исследований для увеличения прикрепления этих клеток к поверхности культуральных планшетов использовали поли-L-лизин («ПанЭко», Россия) в соответствии с протоколом⁴ компании Ibbidi GmbH (Германия). Клетки двух линий культивировались при 37±1 °C с содержанием 5% CO₂.

Сыворотки. В исследовании использовали сыворотки, содержащие анти-ЧикВ АТ (IgG), но не содержащие АТ к вирусам ДенВ, ЗикВ

и вирусу желтой лихорадки (ЖЛВ). Получение сывороток, а также определение в них специфических АТ методами иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции нейтрализации (РН) по 50% подавлению бляшек описано ранее [31]. РН проводили по ранее описанному методу [32]. В качестве контроля использовались сыворотки крови здоровых добровольцев, не содержащие АТ к вышеперечисленным вирусам. Все используемые сыворотки были проверены на наличие специфических РНК к ЧикВ, ДенВ, ЗикВ и ЖЛВ методом ПЦР, как описано ранее [31, 33]. Результаты анализа сывороток представлены в *таблице S2* (онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала⁵).

Определение биологического титра ЧикВ проводили с использованием линии клеток Vero по ранее описанному методу [32]. Кратко: для проведения титрования использовали 24-луночные планшеты со сформированным монослоем клеток. Готовили десятикратные разведения ЧикВ от 10⁻¹ до 10⁻⁹ в питательной среде DMEM; на анализ одного разведения ЧикВ использовали 3 лунки; в каждую лунку вносили по 100 мкл каждого разведения ЧикВ. В контрольные лунки вносили по 100 мкл среды DMEM. Далее планшеты инкубировали в условиях термостата при 37±1 °C и 5% CO₂ в течение 1 ч. Затем неадсорбированный вирус удаляли и на клетки наносили первое покрытие в объеме 0,5 мл, которое содержало 1,5% Noble Agar (Difco, США) и 10% ЭТС в среде Игла MEM с двойным набором витаминов и аминокислот («ПанЭко», Россия). Планшеты инкубировали в условиях термостата при 37±1 °C и 5% CO₂ в течение 4 сут. На 4 сут проводили второе покрытие в объеме 1 мл, которое содержало 1,5% Noble Agar (Difco) в среде Игла MEM с двойным набором витаминов и аминокислот («ПанЭко») с 0,01% нейтральным красным (Sigma, США). Плашки культивировали при ранее описанных условиях еще в течение 1 сут. Бляшки считали *ad oculus*. Результат титрования учитывали по бляшкообразующим единицам (БОЕ) и выражали его в lg/мл [32].

Определение содержания РНК ЧикВ проводили методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), как было описано ранее [34]. Для выделения РНК из образцов использовали комплект реагентов «АмплиСенс® Магно-Сорб» (ФБУН ЦНИИ

² <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761-annex>

³ СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Постановление Главного Государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4.

⁴ Application Note 08. Version 6.2; ibidi GmbH, 2025.

⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761-annex>

Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя. Экстракцию РНК проводили в 50 мкл элюирующего раствора и хранили при минус 70 °С до дальнейшего использования. Амплификацию проводили на приборе «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: 95 °С – 1 мин 30 с; 40 циклов: 95 °С – 15 с, 55 °С – 40 с. Содержание РНК ЧикВ оценивали по показателю порогового цикла флуоресценции (Ct). Расчет Ct проводили с использованием программного обеспечения к амплификатору «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Расчет геном-эквивалентов (ГЭ) проводили согласно описанию в работе [34].

Методика оценки ADE. Оценку ADE проводили, как описано ранее для ДенВ, с использованием клеток FcR-позитивной линии K562 и клеток FcR-негативной линии Vero для сравнительного анализа [35]. Кратко: для получения комплекса ЧикВ + АТ предварительно все сыворотки (табл. S2) были прогреты при 56 °С в течение 30 мин. После этого были приготовлены три разведения каждой сыворотки: цельная (неразведенная), разведение 1:10 и 1:100. Далее каждое разведение сывороток смешивали с ЧикВ (титр 3 lg/мл БОЕ, что соответствовало множественности заражения, MOI, 1:10³ клеток) в объемном соотношении 1:1 (100 мкл сыворотки + 100 мкл вирусной суспензии). Контроль вируса представлял собой ЧикВ (титр 3 lg/мл БОЕ, MOI 1:10³ клеток) в объемном соотношении 1:1 со средой «Игла MEM».

Контроль «смесь» представлял собой ЧикВ и сыворотку здорового добровольца в объемном соотношении 1:1 (100 мкл сыворотки + 100 мкл вирусной суспензии). Далее все приготовленные образцы, включая контрольные, инкубировали при 37±1 °С в течение 60 мин в соответствии с ранее описанными условиями [23]. По окончании инкубации образцы переносили на клетки линий Vero и K562. При использовании клеток линии Vero образцы переносили на заранее подготовленный монослой в лунках 24-луночного планшета и помещали в термостат при 37±1 °С на 2 ч. По окончании контакта в лунки добавляли по 1 мл соответствующей среды поддержки и помещали в термостат при 37±1 °С на 3 сут.

При использовании клеток линии K562 образцы в объеме 100 мкл смешивали со 100 мкл суспензии клеток и в термошейкере (скорость вращения 300 об/мин) снова помещали в термостат при 37±1 °С на 2 ч. По окончании контакта смесь в объеме 200 мкл переносили в лунки

подготовленного, как описано выше, 24-луночного планшета, в которые добавляли соответствующую среду поддержки в объеме 1 мл, и далее помещали в термостат при 37±1 °С на 3 сут. Затем из лунок планшетов собирали жидкость объемом не менее 1 мл, переносили в пробирки и центрифугировали в течение 5 мин при 200 об/мин. После окончания центрифугирования собирали надосадочную жидкость, образцы которой использовали для исследования содержания РНК и определения биологического титра ЧикВ.

Значение суммы среднего значения БОЕ ЧикВ (M), полученного в контроле, и трехкратного значения стандартного отклонения (SD) использовали как пороговое. Усиление репликации ЧикВ, т.е. наличие ADE-феномена, считали подтвержденным, если значения биологического титра ЧикВ в присутствии исследуемой сыворотки были выше 3 SD относительно среднего количества БОЕ в контроле, т.е. выше рассчитанной границы в соответствии с ранее описанным методом оценки [23, 36].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016». Данные представлены в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD). Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента непарного, с двусторонним распределением (*t*-test). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку репликация ЧикВ в клетках линии K562 носит ограниченный по времени характер [37], до начала исследования было проведено изучение репликации в динамике как непосредственно ЧикВ, так и в смеси с контрольной сывороткой в обеих линиях клеток. Результаты проведенных исследований представлены в таблице S3 (онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала⁶). ЧикВ в клетках K562 статистически достоверно размножался до максимальных значений на 2 и 3 сут, при этом разницы между 2 и 3 сут по всем показателям не обнаружено ($p > 0,5$). На 5 сут репликация ЧикВ относительно данных на 2 и 3 сут достоверно снизилась. Поэтому в дальнейших экспериментах анализ титра ЧикВ проводили до 3 сут включительно как для клеток K562, так и клеток Vero. Все показатели, полученные на 3 сут при заражении клеток Vero, достоверно превосходили аналогичные на клетках K562 (табл. S3).

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761-annex>

Для изучения влияния интактной сыворотки человека (контрольные образцы № 2 и 4) на репликацию ЧикВ в клетках обеих линий было проведено заражение клеток «смесью» интактной сыворотки и ЧикВ. Результаты (табл. S3) подтвердили отсутствие значимого влияния интактной сыворотки на репликацию ЧикВ ($p > 0,1$) как для клеток линии K562, так и линии Vero. В дальнейшем для сравнительного анализа

результатов ADE использовали контрольные образцы № 2 и 4 как наиболее адекватные контроли (табл. S3).

Для сравнительного анализа аналогичные эксперименты были проведены с использованием клеток линии Vero. Результаты исследования образцов сывороток с разными титрами специфических АТ к ЧикВ с использованием клеток линии Vero представлены в таблице 1.

Таблица 1. Репликация вируса Чикунгунья (ЧикВ) в присутствии исследуемых образцов сывороток в клетках линии Vero по данным метода ОТ-ПЦР-РВ и определения биологического титра

Table 1. Chikungunya virus (ChikV) replication in Vero cells in the presence of the studied serum samples according to the qRT-PCR and biological titer results

Образец сыворотки (титр в РН) <i>Serum sample (PNT titer)</i>	Разведение образца <i>Sample dilution</i>	ОТ-ПЦР-РВ (Ct) <i>qRT-PCR (Ct)</i>	ГЭ (lg/мл) <i>GE (lg/mL)</i>	Биологический титр ЧикВ (lg БОЕ/мл) <i>Biological titer ChikV (lgPFU/mL)</i>
Неиммунная сыворотка <i>Nonimmune serum</i> (Контроль № 4) ^a	Цельная <i>No dilution</i>	13,53±0,21**	8,05±0,06**	8,52±0,16**
	1:10	13,55±0,30**	8,03±0,05**	8,50±0,09**
	1:100	13,50±0,35**	8,09±0,09**	8,45±0,06**
№ 1 (1:381)	Цельная <i>No dilution</i>	29,15±0,13*	3,24±0,05*	3,48±0,07*
	1:10	24,87±0,35***	4,55±0,11***	4,50±0,05***
	1:100	17,63±0,37***	7,07±0,21***	7,49±0,04***
№ 2 (1:320)	Цельная <i>No dilution</i>	28,95±0,17*	3,28±0,05*	3,51±0,03*
	1:10	25,13±0,21***	4,47±0,06***	4,53±0,03***
	1:100	16,47±0,21***	7,45±0,45***	7,70±0,07***
№ 3 (1:320)	Цельная <i>No dilution</i>	29,13±0,06*	3,24±0,02*	3,53±0,03*
	1:10	24,77±0,23***	4,58±0,08***	4,62±0,08***
	1:100	16,63±0,44***	7,71±0,45**	7,93±0,24***
№ 4 (1:198)	Цельная <i>No dilution</i>	28,77±0,49*	3,35±0,15*	3,46±0,04*
	1:10	22,93±0,40***	5,15±0,12***	5,26±0,13***
	1:100	13,77±0,06**	7,98±0,02**	8,23±0,06***

Примечание. Множественность заражения ЧикВ для клеток обеих линий была идентичной — $1:10^3$ клеток. Неиммунная сыворотка — сыворотка здорового взрослого человека с подтвержденным отсутствием антител к вирусам денге, Чикунгунья, Зика и вирусу желтой лихорадки. Ct — показатель порогового цикла флуоресценции; ГЭ — геном-эквивалент; РН — реакция нейтрализации; БОЕ — бляшкообразующие единицы; ОТ-ПЦР-РВ — метод ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. Данные представлены как $M \pm SD$ (среднее арифметическое значение $\pm$ стандартное отклонение).

* $p < 0,05-0,001$, при сравнительном анализе результатов репликации ЧикВ в исследуемых образцах статистическую достоверность оценивали относительно соответствующих данных контрольного образца K4.

** $p < 0,001$ относительно показателей ЧикВ в присутствии этого же образца цельной сыворотки.

^a данные представлены повторно для удобства сравнения.

Note. Multiplicity of infection of ChikV for the cells of both lines was identical — $1:10^3$ cells. Non-immune serum was the serum of a healthy adult with a confirmed absence of antibodies to the following viruses: Dengue, Chikungunya, Zika and yellow fever. Ct, threshold fluorescence cycle; GE, genome equivalent; PNT, plaque neutralization test; PFU, plaque-forming unit; qRT-PCR, real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

The data is presented as $M \pm SD$ (arithmetic mean $\pm$ standard deviation).

* $p < 0.05-0.001$, in a comparative analysis of the ChikV replication results in the studied samples, statistical reliability was assessed relative to the corresponding control sample K4 data.

** $p < 0.001$ in a comparative analysis of the ChikV replication rates in the presence of the same not diluted serum sample.

^a the data are presented again for ease of comparison.

Из представленных в *таблице 1* данных следует, что нейтрализующая активность у исследуемых сывороток статистически достоверно сохранялась даже при максимальном разведении (1:100) и титр ЧикВ был статистически ниже, чем в соответствующем образце К4. Каждое последующее разведение иммунных сывороток приводило к соответствующему усилению репликации ЧикВ. Образцы сывороток № 2 и 3, имеющие одинаковые титры анти-ЧикВ АТ по результатам ИФА и РН, также не имели статистически значимых различий при разведении по всем показателям репликации ЧикВ. Для всех сывороток корреляция между показателями Ст и БОЕ была сильной отрицательной, $r = \text{минус } 0,995$.

Результаты исследования репликации ЧикВ в присутствии образцов сывороток с разными титрами специфических АТ к ЧикВ с использованием клеток линии K562 представлены в *таблице 2*.

Результаты, представленные в *таблице 2*, свидетельствуют о том, что все специфические сыворотки, независимо от титра в РН, в неразведенном состоянии обладали выраженными нейтрализующими свойствами, что подтверждено статистически достоверным снижением всех показателей репликации ЧикВ относительно соответствующих показателей образца К2. Образцы сывороток № 2 и 3, имеющие одинаковые титры анти-ЧикВ АТ по результатам РН, не имели статистически значимых различий по всем показателям репликации ЧикВ во всех разведениях. Сыворотка № 1 с максимальным титром анти-ЧикВ АТ сохраняла свои нейтрализующие свойства при всех разведениях. Следует отметить, что каждое последующее разведение сыворотки № 1 приводило к усилению репликации. Наиболее интересными были результаты исследования образцов сывороток № 2, 3 и 4 в промежуточном разведении 1:10. В данном разведении полученные результаты продемонстрировали максимальные показатели репликации ЧикВ, которые достоверно превышали таковые у соответствующих образцов контроля К2; также полученные показатели достоверно превышали показатели репликации ЧикВ последующего разведения сыворотки 1:100. При максимальном разведении 1:100 показатели репликации ЧикВ в присутствии всех сывороток были близки к соответствующим показателям К2 ($p > 0,01$), что можно расценить как значительное снижение нейтрализующей активности, вплоть до ее отсутствия. Для всех сывороток корреляция между показателями Ст и БОЕ была сильной отрицательной: $r = \text{минус } 0,899$.

Усиление репликации ЧикВ в присутствии специфических сывороток, т.е. появление эффекта ADE, оценивали относительно пограничного уровня ($M+3 \text{ SD}$), рассчитанного в соответствии с описанием в разделе «Методы», для биологического титра ЧикВ. Результаты оценки репликации ЧикВ по данным биологического титра в клетках линии Vero в присутствии специфических сывороток в разных разведениях представлены на *рисунке 1А*, а для клеток линии K562 – на *рисунке 1В*. Горизонтальные линии на рисунках обозначают пороговые значения, относительно которых анализировали активность исследуемых сывороток. Для клеток линии K562 диапазон пороговых значений репликации ЧикВ был рассчитан с учетом данных К2 для неразведенного образца, $4,61 \pm (3 \times 0,05) \lg \text{ БОЕ/мл}$ (*табл. 2*). Для клеток линии Vero диапазон пороговых значений репликации ЧикВ был рассчитан с учетом данных К4 для неразведенного образца, $8,50 \pm (3 \times 0,05) \lg \text{ БОЕ/мл}$ (*табл. 1*). Разграничение между усиливающей репликацию вируса (усиливающей инфекцию) и нейтрализующей вирус активностью сыворотки проводили, как описано ранее [23].

Титр ЧикВ выше верхней (пороговой) линии указывал на усиление репликации вируса, т.е. усиление инфекционной активности сыворотки. Титр ЧикВ ниже нижней пороговой линии указывал на нейтрализующую активность сыворотки. В экспериментах на клетках линии Vero (*рис. 1*) биологический титр ЧикВ в присутствии сывороток с разным титром АТ и в разных разведениях всегда оставался ниже нижнего порогового значения, несмотря на то что при каждом последующем разведении сыворотки титр вируса ЧикВ ожидаемо увеличивался. Таким образом, в клетках линии Vero эффект ADE не был зафиксирован. В клетках линии Vero присутствие сыворотки в любом разведении позволяло выявить только нейтрализующую активность специфических АТ.

В клетках линии K562 присутствие специфических АТ по-иному повлияло на репликацию ЧикВ. Сыворотка № 1 оказывала нейтрализующее действие во всех разведениях, т.е. все показатели биологического титра ЧикВ были ниже нижнего порогового значения. Все остальные сыворотки, № 2, 3 и 4, в неразведенном варианте проявили нейтрализующую активность; показатели биологического титра ЧикВ были ниже нижнего порогового значения. В разведении 1:10 образцы сывороток № 2, 3 и 4 статистически достоверно усиливали репликацию ЧикВ, что было подтверждено данными биологического титра, а также данными ОТ-ПЦР-РВ.

Таблица 2. Репликация вируса Чикунгунья (ЧикВ) в присутствии исследуемых образцов сывороток в клетках линии K562 по данным метода ОТ-ПЦР-РВ и определения биологического титра**Table 2.** Chikungunya virus (ChikV) replication in K562 cells in the presence of the studied serum samples according to the qRT-PCR and biological titer results

Образец сыворотки (титр в РН) <i>Serum sample (PNT titer)</i>	Разведение образца <i>Sample dilution</i>	ОТ-ПЦР-РВ (Ct) <i>qRT-PCR (Ct)</i>	ГЭ (lg/мл) <i>GE (lg/mL)</i>	Биологический титр ЧикВ (БОЕ, lg/мл) <i>Biological titer ChikV (lgPFU/mL)</i>
Неиммунная сыворотка <i>Nonimmune serum</i> (Контроль № 2) ^а <i>(Control No. 2)^о</i>	Цельная <i>No dilution</i>	24,47±0,15**	4,68±0,05**	4,61±0,05**
	1:10	24,56±0,09**	4,72±0,06**	4,66±0,07**
	1:100	24,52±0,14**	4,67±0,04**	4,70±0,07**
№ 1 (1:381)	Цельная <i>No dilution</i>	26,7±0,27*	3,99±0,08*	3,43 ±0,09*
	1:10	25,0±0,35*	4,50±0,08*	4,06 ±0,50*
	1:100	24,7±0,10**	4,60±0,04**	4,73±0,12**
№ 2 (1:320)	Цельная <i>No dilution</i>	26,17±0,25*	4,15±0,08*	3,82±0,07*
	1:10	23,53±0,15***	4,97±0,05***	4,91±0,02***
	1:100	24,60±0,10**	4,64±0,04**	4,63±0,03**
№ 3 (1:320)	Цельная <i>No dilution</i>	26,96±0,21*	3,91±0,07*	3,61±0,07*
	1:10	23,40±0,20***	5,01±0,07***	4,97±0,06***
	1:100	25,13±0,21**	4,46±0,07**	4,73±0,06**
№ 4 (1:198)	Цельная <i>No dilution</i>	26,67±0,23*	4,00±0,07*	3,65±0,02*
	1:10	23,17±0,06***	5,08±0,02***	4,93±0,07***
	1:100	24,97±0,21**	4,55±0,12**	4,70±0,06**

Примечание. Множественность заражения ЧикВ для клеток обеих линий была идентичной — 1:10³ клеток. Неиммунная сыворотка — сыворотка здорового взрослого человека с подтвержденным отсутствием антител к вирусам денге, Чикунгунья, Зика и вирусу желтой лихорадки. Ct — показатель порогового цикла флуоресценции; ГЭ — геном-эквивалент; РН — реакция нейтрализации; БОЕ — бляшкообразующие единицы; ОТ-ПЦР-РВ — метод ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. Данные представлены как $M \pm SD$ (среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение).

* $p < 0,005$, при сравнительном анализе результатов репликации ЧикВ в исследуемых образцах статистическую достоверность оценивали относительно соответствующих данных контрольного образца K2.

** $p < 0,005$ относительно показателей репликации ЧикВ в присутствии этого же образца цельной сыворотки.

^а данные представлены повторно для удобства сравнения.

Note. Multiplicity of infection of ChikV for the cells of both lines was identical — 1:10³ cells. Non-immune serum was the serum of a healthy adult with a confirmed absence of IgG to the following viruses: Dengue, Chikungunya, Zika and yellow fever. Ct, threshold fluorescence cycle; GE, genome equivalent; PNT, plaque neutralization test; PFU, plaque-forming unit; qRT-PCR, real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

The data is presented as $M \pm SD$ (arithmetic mean $\pm$ standard deviation).

* $p < 0,005$, in a comparative analysis of the ChikV replication results in the studied samples, statistical reliability was assessed relative to the corresponding control sample K2 data.

** $p < 0,005$ in a comparative analysis of the ChikV replication rates in the presence of the same not diluted serum sample.

^а the data are presented again for ease of comparison.

Биологический титр ЧикВ превысил верхнее пограничное значение, т.е. был достоверно выше, чем у контрольного образца K2, а также титра ЧикВ соответствующего неразведенного образца ($p < 0,01$), что в совокупности было расценено как эффект ADE. Следует отметить, что последующее разведение данных сывороток 1:100 привело к достоверному снижению титра ЧикВ, который оказался внутри диапазона

пороговых значений, что свидетельствовало как об отсутствии усиления репликации ЧикВ, так и об отсутствии нейтрализующей активности специфической сыворотки. Для оценки уровня усиления репликации ЧикВ было рассчитано соотношение показателя биологического титра ЧикВ для K2 к показателю биологического титра ЧикВ для образцов сывороток № 2, 3 и 4 в разведении 1:10, как было предложено ранее [23, 38].

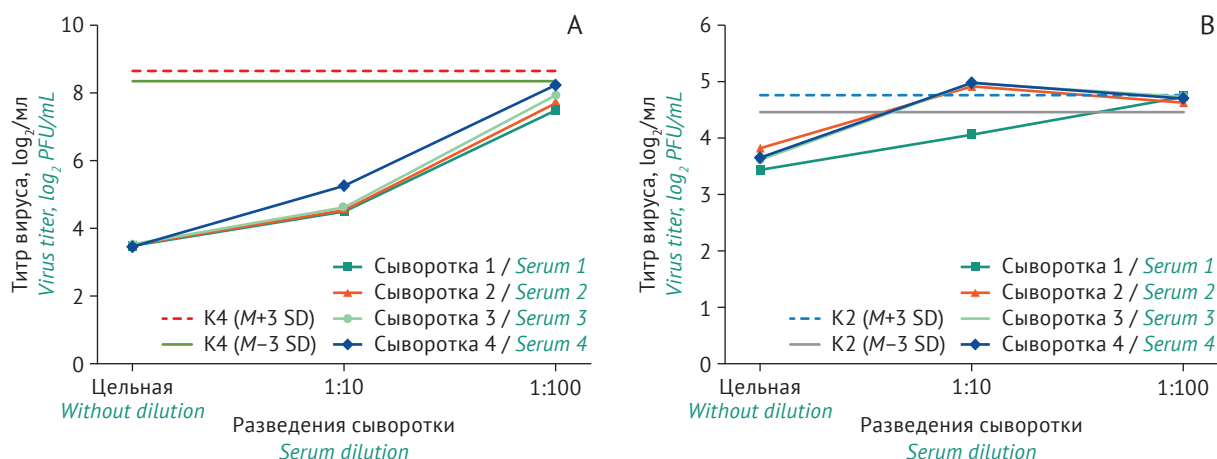


Рис. 1. Биологический титр ЧикВ в присутствии исследуемых образцов сывороток в разных разведениях: А – клетки линии Vero относительно пороговых значений соответствующего контроля К4 (ЧикВ плюс неиммунная сыворотка); В – клетки линии K562 относительно пороговых значений соответствующего контроля К2 (ЧикВ плюс неиммунная сыворотка). М – среднее арифметическое значение; SD – стандартное отклонение.

Fig. 1. Biological titer of ChikV in the presence of the testing samples of sera at different dilutions A, Vero cells, relative to the threshold values of the corresponding K4 control (ChikV plus non-immune serum). B, K562 cells, relative to the threshold values of the corresponding K2 control (ChikV plus non-immune serum). M, mean value; SD, standard deviation; PFU, plaque-forming unit.

Данные биологического титра были переведены в антилогарифмы; получены следующие результаты: для образца № 2 усиление биологического титра ЧикВ составило 142%, образца № 3 – 162% и образца № 4 – 166%.

Данные репликации ЧикВ, полученные методом ОТ-ПЦР-РВ, и соответственно данные ГЭ как зависимого показателя полностью повторяли изменения биологического титра ЧикВ во всех экспериментах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вирусы, для которых характерен феномен ADE, имеют общие признаки, а именно: частичная или исключительная репликация в макрофагах; индуцирование продукции большого количества АТ с низкой нейтрализующей активностью даже относительно гомологичного вируса и способность вызывать персистирующие инфекции, которые характеризуются длительно продолжающейся вирусемией. Антигенное разнообразие среди изолятов также является общей особенностью таких вирусов, что и делает их частично устойчивыми к нейтрализации АТ, вырабатываемыми против гетерологичных изолятов [39, 40]. ЧикВ, как и ДенВ, относится к такой группе вирусов.

Для ДенВ проводятся многочисленные исследования эффекта ADE, особенно в свете необходимости создания эффективной и безопасной вакцины. Единственное, по нашим данным, исследование ADE при ЧикВ инфекции *in vitro* было проведено с использованием первичных клеток человека и клеточной линии макрофагов мыши

RAW264.7 в присутствии специфических сывороток, с субнейтрализующими титрами АТ [26]. В данном исследовании показано, что ЧикВ инфицировал как первичные моноциты и В-клетки человека, так и мышинные клетки RAW264.7. Полученные результаты авторы объяснили тем, что клетки человека и мыши экспрессируют разные FcγR и поэтому, вероятно, имеют разные пути развития ADE.

Экспериментальная инфекция ЧикВ у трехнедельных мышей показала, что у особей с более низкими титрами ЧикВ-специфических АТ вирусная нагрузка была выше, а воспаление суставов выражено сильнее; а у мышей в возрасте 11 сут наличие низких титров АТ сопровождалось не только более высокой вирусной нагрузкой в мышцах, но и приводило к смерти животных [26]. Таким образом, F.M. Lum с соавт. [26] впервые экспериментально продемонстрировали, что АТ могут усиливать инфекцию ЧикВ. Было предположено, что ограниченная репликация ЧикВ, наблюдаемая в моноцитах и В-клетках человека, может быть формой «подрывной» деятельности ЧикВ для достижения хронизации патологического процесса [41]. Персистирующие артралгии после перенесенной инфекции ЧикВ можно объяснить развитием при определенных условиях ADE, как и у других «артритогенных» альфа-вирусов, таких как вирус Ross River [42, 43].

Опираясь на опыт исследований феномена ADE при ДенВ *in vitro*, мы использовали клетки линии K562. Сравнительные исследования репликации ЧикВ в клетках линии Vero и K562 в нашей работе убедительно продемонстрировали

специфичность феномена ADE. Репликация ЧикВ в клетках линии Vero в нашем эксперименте подтвердила высокую чувствительность данной линии клеток к вирусу и возможность использования ее исключительно для анализа нейтрализующей активности специфических АТ. Клетки FcR-экспрессирующей линии K562 позволили анализировать обе функции АТ: нейтрализующую вирус и активирующую вирусную инфекцию, а также позволили разграничить одну функцию от другой. Возможность проведения подобного рода исследований *in vitro* упрощает исследование феномена ADE в целом.

В представленной работе ADE был обнаружен в промежуточном разведении сывороток со средним или низким титром вируснейтрализующих анти-ЧикВ АТ. Феномен ADE, т.е. усиления репликации вируса, был ранее продемонстрирован для ДенВ в присутствии именно промежуточных разведений специфических сывороток. Длительное наблюдение за детской когортой, которая неоднократно сталкивалась с инфекцией ДенВ, показало, что низкие уровни АТ не усиливали болезнь, а высокие уровни могли успешно защитить от тяжелой формы заболевания. При этом именно промежуточные уровни анти-ДенВ АТ были связаны с ADE и тяжелым течением заболевания [44]. У вакцинированных препаратом Dengvaxia эффект ADE также был обнаружен в промежуточных разведениях сыворотки [30]. Эти исследования подчеркивают неоднозначность корреляции иммунных показателей с протективностью.

В течение достаточно длительного времени методы исследования ADE с использованием FcR-экспрессирующих клеток модифицировались и совершенствовались. Так, например, А. Yamanaka с соавт. [24] оценивали ADE по уровню инфицированных клеток линии K562 и вместо натурального вируса использовали химерные вирусные частицы на основе четырех штаммов ДенВ. Этот метод имел преимущество высокопроизводительного скрининга, но недостаточно имитировал условия *in vivo*, так как вирус в данном методе представлял собой рекомбинантный белок [24]. В другой экспериментальной работе было продемонстрировано, что только с использованием ДенВ, выделенного непосредственно от пациента, можно *in vitro* подтвердить вероятность развития ADE, в то время как при использовании рекомбинантного вируса результаты были неубедительными [45].

Как известно, размер вирусных частиц, а также количество и плотность расположения поверхностных антигенных детерминант у рекомбинантного штамма могут сильно отличаться

от таковых у нативного вируса [16]. В нашем исследовании мы использовали нативный ЧикВ и, таким образом, исключили влияние структурных особенностей вируса на результат *in vitro*. Ряд исследователей оценивали ADE при инфекции ДенВ также по инфекционному титру, но при этом использовали специально созданную ими линию клеток ВНК, экспрессирующую FcγRIIA [22, 38, 44]. В примененном нами подходе ADE оценивали в FcγRII-экспрессирующих клетках линии K562 по инфекционному (биологическому) титру ЧикВ и дополнительно по содержанию вирусной РНК. Преимуществом предложенного нами подхода является возможность оценить риск развития ADE стандартным методом прямого титрования бляшек (биологический титр вируса). Данные репликации ЧикВ, полученные в нашем исследовании методом ОТ-ПЦР-РВ и, соответственно, данные ГЭ как независимого показателя полностью повторяли изменения биологического титра ЧикВ во всех экспериментах. По нашему мнению, при высокой корреляции показателей биологического титра вируса и показателей ОТ-ПЦР-РВ можно разработать критерии оценки ADE по результатам, полученным методом ОТ-ПЦР-РВ, что значительно ускорит и упростит проведение анализа. Безусловно, такой подход к оценке ADE требует большой подготовительной работы.

Ранее М.Л. Мої с соавт. [38] продемонстрировали, что концентрация АТ, а не соотношение между АТ и ДенВ, оказалась ключевым параметром для оценки усиления инфекции с помощью FcR-экспрессирующих клеток. Следует иметь в виду определенные различия в фоновом росте и пороге заражения разных вирусов или их серотипов при использовании той или иной линии клеток. В проведенном исследовании мы предварительно подобрали оптимальную дозу заражения ЧикВ (MOI — $1:10^3$ на клетку) для клеточной линии K562 и проанализировали динамику репликации ЧикВ двумя методами, затем изучили инфекционную активность ЧикВ в присутствии иммунных сывороток и таким образом продемонстрировали возможности данного подхода для анализа ADE.

Используя FcγRII-экспрессирующую линию клеток K562, мы опирались не только на опыт предыдущих исследователей, но и на тот факт, что внутриклеточная часть FcγRII является основной детерминантой в развитии ADE [19]. Известно, что связь между FcγR и комплексом вирус-АТ контролирует развитие ADE посредством поглощения иммунного комплекса и влияния на баланс между активацией и ингибированием FcγRI, FcγRII и FcγRIII. FcγRII

является низкоаффинным рецептором и требует высокоаффинного соединения с комплексом «вирус-АТ». Если последнее условие по каким-то причинам невыполнимо, сформированный иммунный комплекс из-за низкого сродства с FcγRIIa высвобождается внутри клетки, что, в свою очередь, влияет на врожденный иммунитет, который может переключиться от противовирусного состояния к иммуносупрессии. Безусловно, фагоцитирующая клеточная линия может иметь значимые отличия от первичных клеток человека. Весьма вероятно, именно поэтому ADE при исследовании чаще регистрируют *in vitro*, чем *in vivo* [16].

Следует учитывать и другие возможные механизмы развития ADE. Например, комплемент-опосредованное ADE, развитие которого может быть синергично с FcγR, но может и быть самостоятельным. В нашем исследовании мы исключили влияние комплемента во всех использованных сыворотках путем их предварительного прогревания; ADE оценивали относительно контроля, который представлял собой не ЧикВ как таковой, а «смесь» ЧикВ с сывороткой крови здорового добровольца, расценив данный вариант контроля как наиболее адекватный.

Остается неясным, будет ли высокая активность ADE коррелировать с тяжестью заболевания. Для более детального изучения этой связи требуется проспективное когортное исследование, которое поможет прояснить, насколько эффективны используемые на данном этапе методы оценки ADE *in vitro* в прогнозировании риска тяжелого течения болезни у пациентов или вакцинированных [24]. Так, например, в исследованиях тетравалентной живой вакцины Dengvaxia (Sanofi Pasteur, Франция) после однократного применения у 113 детей с использованием 4-х серотипов ДенВ и клеток K562 в единичных случаях было обнаружен «минимальный уровень ADE» при использовании сыворотки в разведении 1:12, что, по мнению авторов, соответствовало состоянию *in vivo*. При более высоких разведениях сыворотки возникала корреляция между спектром АТ и одновременным падением титра АТ и соответственно риском развития ADE. В целом у 28 детей был обнаружен ADE при использовании в анализе одного или 2–3 серотипов ДенВ [30].

После анализа результатов III фазы клинических исследований Dengvaxia было отмечено,

что только IV фаза и постмаркетинговое наблюдение смогут дать окончательный ответ, представляет ли ADE риск для реципиентов данной вакцины. В итоге в 2019 г. FDA (США) одобрило использование вакцины Dengvaxia только для детей в возрасте от 9 до 16 лет, которые ранее переболели лихорадкой денге и живут в районах, где это заболевание распространено, так как у детей, вакцинированных в возрасте от 2 до 5 лет, был выявлен риск госпитализации с тяжелой формой лихорадки денге в 8 раз чаще по сравнению с группой плацебо [46].

История применения тетравакцины против ДенВ компанией Sanofi Pasteur вызвала опасения по поводу ценности теста нейтрализации *in vitro* как прогностического показателя защиты *in vivo* и заставила менять подходы к оценке иммунологической безопасности разрабатываемых вакцин и продолжать работу над исследованием феномена ADE.

В Российской Федерации был предложен алгоритм доклинических исследований разрабатываемых вакцин с учетом оценки риска развития ADE, которому, по сути, мы и следовали в данной работе [47]. В представленном исследовании впервые в нашей стране не только предпринята попытка опробовать метод детекции ADE, используя клетки линии K562 и традиционный метод титрования вируса, но и проведена оценка риска развития ADE, используя сыворотки с разным титром специфических анти-ЧикВ АТ.

ВЫВОДЫ

1. Репликация вируса Чикунгунья в FcR-негативных клетках линии Vero подтвердила высокую чувствительность данной линии клеток к вирусу и возможность использования ее исключительно для оценки нейтрализующей активности специфических антител.
2. Клетки FcR-экспрессирующей линии K562 позволили анализировать обе функции антител: и нейтрализующую вирус, и активирующую инфекцию.
3. Результаты работы подтвердили возможность проведения исследований антителозависимого усиления инфекции *in vitro*, что значительно упрощает исследование данного феномена при оценке безопасности разрабатываемых вакцин.

Литература/References

1. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med.* 1977;146(1):201–17. <https://doi.org/10.1084/jem.146.1.201>
2. Takada A, Kawaoka Y. Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and *in vivo* implications. *Rev Med Virol.* 2003;13(6):387–98. <https://doi.org/10.1002/rmv.405>

3. Yang X, Zhang X, Zhao X, et al. Antibody-dependent enhancement: "Evil" antibodies favorable for viral infections. *Viruses*. 2022;14(8):1739. <https://doi.org/10.3390/v14081739>
4. Graham BS. Vaccines against respiratory syncytial virus: The time has finally come. *Vaccine*. 2016;34(30):3535–41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.083>
5. Polack FP. Atypical measles and enhanced respiratory syncytial virus disease (ERD) made simple. *Pediatr Res*. 2007;62(1):111–5. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3180686ce0>
6. Langerak T, Mumtaz N, Tolk VI, et al. The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2019;15(4):e1007640. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007640>
7. Junqueira C, Crespo A, Ranjbar S, et al. FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature*. 2022;606(7914):576–84. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04702-4>
8. Kuzmina NA, Younan P, Gilchuk P, et al. Antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection by human antibodies isolated from survivors. *Cell Rep*. 2018;24(7):1802–15.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.035>
9. Ignatyev GM, Agafonov AP, Streltsova MA, Kashentseva EA. Inactivated Marburg virus elicits a nonprotective immune response in Rhesus monkeys. *J Biotechnol*. 1996;44(1–3):111–8. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00104-2](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00104-2)
10. Stiasny K, Medits I, Roßbacher L, Heinz FX. Impact of structural dynamics on biological functions of flaviviruses. *FEBS J*. 2023;290(8):1973–85. <https://doi.org/10.1111/febs.16419>
11. Hawkes RA. Enhancement of the infectivity of arboviruses by specific antisera produced in domestic fowls. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1964;42:465–82. <https://doi.org/10.1038/icb.1964.44>
12. Halstead SB, Chow JS, Marchette NJ. Immunological enhancement of dengue virus replication. *Nat New Biol*. 1973;243(122):24–6. PMID: 17319077
13. Peiris JS, Gordon S, Unkeless JC, Porterfield JS. Monoclonal anti-Fc receptor IgG blocks antibody enhancement of viral replication in macrophages. *Nature*. 1981;289(5794):189–91. <https://doi.org/10.1038/289189a0>
14. Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, et al. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(10):712–22. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70166-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70166-3)
15. Thomas S, Smatti MK, Ouhiti A, et al. Antibody-dependent enhancement (ADE) and the role of complement system in disease pathogenesis. *Mol Immunol*. 2022;152:172–82. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.11.010>
16. Burton DR. Antiviral neutralizing antibodies: from *in vitro* to *in vivo* activity. *Nat Rev Immunol*. 2023;23(11):720–34. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00858-w>
17. Bournazos S, Gupta A, Ravetch JV. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(10):633–43. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00410-0>
18. Xu L, Ma Z, Li Y, et al. Antibody dependent enhancement: Unavoidable problems in vaccine development. *Adv Immunol*. 2021;151:99–133. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2021.08.003>
19. Mader K, Dustin LB. Beyond bNAbs: Uses, risks, and opportunities for therapeutic application of non-neutralising antibodies in viral infection. *Antibodies (Basel)*. 2024;13(2):28. <https://doi.org/10.3390/antib13020028>
20. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, et al. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. 2016;536(7614):48–53. <https://doi.org/10.1038/nature18938>
21. Sawant J, Patil A, Kurlle S. A review: Understanding molecular mechanisms of antibody-dependent enhancement in viral infections. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(7):1240. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071240>
22. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, et al. Development of an antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing Fc gammaRIIA. *J Virol Methods*. 2010;163(2):205–9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.09.018>
23. Konishi E, Tabuchi Y, Yamanaka A. A simple assay system for infection-enhancing and -neutralizing antibodies to dengue type 2 virus using layers of semi-adherent K562 cells. *J Virol Methods*. 2010;163(2):360–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.10.026>
24. Yamanaka A, Rattanaamnuaychai P, Matsuda M, et al. Development of a rapid assay system for detecting antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol Methods*. 2023;311:114641. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114641>
25. Huang X, Yue Y, Li D, et al. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection inhibits RLR-mediated type-I IFN-independent signalling through upregulation of cellular autophagy. *Sci Rep*. 2016;6:22303. <https://doi.org/10.1038/srep22303>
26. Lum FM, Couderc T, Chia BS, et al. Antibody-mediated enhancement aggravates chikungunya virus infection and disease severity. *Sci Rep*. 2018;8(1):1860. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20305-4>
27. Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, et al. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol*. 2011;85(4):1671–83. <https://doi.org/10.1128/JVI.00220-10>
28. Chotiwan N, Roehrig JT, Schlesinger JJ, et al. Molecular determinants of dengue virus 2 envelope protein important for virus entry in FcγRIIA-mediated antibody-dependent enhancement of infection. *Virology*. 2014;456–457:238–46. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.03.031>
29. He RT, Innis BL, Nisalak A, et al. Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. *J Med Virol*. 1995;45(4):451–61. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890450417>
30. Guy B, Chanthavanich P, Gimenez S, et al. Evaluation by flow cytometry of antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue infection by sera from Thai children immunized with a live-attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*. 2004;22(27–28):3563–74. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.042>
31. Отрашевская ЕВ, Казакова ЕВ, Жиленкина ЕН и др. Ретроспективный серологический анализ распространения flavирусных лихорадок и лихорадки Чикунгунья в Никарагуа — авидность специфических антител как инструмент дифференциальной диагностики. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):215–24. Отрашевская ЕВ, Казакова ЕВ, Жиленкина ЕН, et al. The study of flaviviruses and Chikungunya virus seroprevalence in Nicaragua — virus-specific antibody avidity assay as a tool for differential diagnosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(2):215–24 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-196>
32. Chusri S, Siripaitoon P, Silpapojakul K, et al. Kinetics of chikungunya infections during an outbreak in Southern Thailand, 2008–2009. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(3):410–17. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0681>
33. Игнатьев ГМ, Каа КВ, Оксанич АС и др. Индикация и идентификация вирусов денге и Чикунгунья в комарах рода *Aedes* spp., отловленных в Центральной Америке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(3):227–32. Ignatyev GM, Kaa KV, Oksanich AS, et al. Indication and identification of Dengue and Chikungunya viruses in *Aedes* spp. mosquitoes captured in Central America. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(3):227–32 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-4>
34. Оксанич АС, Самарцева ТГ, Каа КВ и др. Молекулярно-генетические методы контроля качества инактивированных вакцин на модели вируса Чикунгунья: подлинность штамма и полнота инактивации вируса. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):279–93. Oksanich AS, Samartseva TG, Kaa KV, et al. Molecular genetic methods for quality control of inactivated vaccines using a Chikungunya virus model: vaccine strain identification and completeness of virus inactivation. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(3):279–93 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-3-279-293>
35. Moi ML, Takasaki T, Kurane I. Detection of virus-antibody immune complexes in secondary Dengue virus infection. *Methods Mol Biol*. 2018;1604:331–7. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6981-4_25
36. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, et al. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR-negative cells in secondary infection but not in primary infection. *J Infect Dis*. 2011;203(10):1405–14. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir053>
37. Taraphdar D, Singh B, Pattanayak S, et al. Comodulation of Dengue and Chikungunya virus infection during a coinfection scenario in human cell lines. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:821061. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.821061>
38. Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Determination of antibody concentration as the main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells. *Arch Virol*. 2014;159(1):103–16. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1787-3>

39. Halstead SB. Dengue antibody-dependent enhancement: Knowns and unknowns. *Microbiol Spectr*. 2014;2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014>
40. Tirado SM, Yoon KJ. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol*. 2003;16(1):69–86. <https://doi.org/10.1089/088282403763635465>
41. Sallie R. Replicative homeostasis: A fundamental mechanism mediating selective viral replication and escape mutation. *Virology*. 2005;2:10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-10>
42. Linn ML, Aaskov JG, Suhrbier A. Antibody-dependent enhancement and persistence in macrophages of an arbovirus associated with arthritis. *J Gen Virol*. 1996;77(Pt 3):407–11. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-3-407>
43. Atella MO, Carvalho AS, Da Poian AT. Role of macrophages in the onset, maintenance, or control of arthritis caused by alphaviruses. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2023;248(22):2039–44. <https://doi.org/10.1177/15353702231214261>
44. Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017;358(6365):929–32. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
45. Chaichana P, Okabayashi T, Puirom O, et al. Low levels of antibody-dependent enhancement *in vitro* using viruses and plasma from dengue patients. *PLoS One*. 2014;9(3):e92173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092173>
46. Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, et al. Efficacy and long-term safety of a Dengue vaccine in regions of endemic disease. *N Engl J Med*. 2015;373(13):1195–206. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506223>
47. Миронов АН, Супотницкий МВ, Лебединская ЕВ. Феномен антитело-зависимого усиления инфекции у вакцинированных и переболевших. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2013;(3):12–25. Mironov AN, Supotnitskiy MV, Lebedinskaya EV. The phenomenon of antibody-dependent enhancement of infection in vaccinated and convalescents. *BIOpreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2013;(3):12–25 (In Russ.). EDN: [RDXVHD](https://doi.org/10.1126/science.aan6836)

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены *таблицы S1–S3*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Отрашевская** — разработка дизайна исследования, проведение исследований, анализ и интерпретация результатов исследований, статистическая обработка, написание рукописи; **Т.Г. Самарцева** — проведение исследований, анализ и интерпретация результатов исследования; **А.С. Оксанич** — анализ результатов, критический анализ текста; **С.С. Гогина** — проведение исследований; **В.В. Зверев** — обсуждение концепции исследования, обобщение результатов исследования, критический пересмотр текста рукописи; **Г.М. Игнатьев** — обоснование концепции исследования, разработка дизайна исследований, непосредственное участие в выполнении работ, написание рукописи.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (протокол № 17/2025 от 25.11.2020).

Supplementary information. *Tables S1–S3* are available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-761-annex>

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Otrashevskaja** developed study design, conducted experiments and statistical analysis, analysed and interpreted the results, drafted the manuscript. **T.G. Samartseva** conducted the experiments, analysed and interpreted the results. **A.S. Oksanich** analysed and interpreted the results obtained, performed critical analysis of the manuscript. **S.S. Gogina** conducted the experiments. **V.V. Zverev** discussed the study concept, generalized of the results obtained, critically revised the manuscript. **G.M. Ignatyev** conceptualized the research, developed study design, conducted the experiments, and drafted the manuscript.

Ethics approval. The study protocol was approved by the local ethics committee of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (meeting minutes No. 17/2025 dated November 25, 2020).

Об авторах / Authors

Отрашевская Елена Викторовна / Elena V. Otrashevskaja

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2491-4072>

Самарцева Татьяна Геннадьевна / Tatyana G. Samartseva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Оксанич Алексей Сергеевич, канд. биол. наук / Aleksey S. Oksanich, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Гогина Софья Сергеевна / Sofya S. Gogina

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-2889-9680>

Зверев Виталий Васильевич, д-р биол. наук, проф., академик РАН / Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Acad. RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф. / George M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Поступила 24.12.2025

После доработки 11.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Online first 28.04.2026

Received December 24, 2025

Revised February 11, 2026

Accepted March 13, 2026

Online first April 28, 2026



Бифункциональные гибридные белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 на основе Z-домена белка A *Staphylococcus aureus* для иммунофлуоресцентного анализа иммуноглобулинов G в сыворотке крови

А.М. Елисейкин , И.В. Маргатский , В.Е. Артемов, А.В. Марущак ,
И.С. Понкратенко, А.Н. Глушков , А.Е. Студенников

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения
Российской академии наук», Институт экологии человека, пр. Ленинградский, д. 10,
Кемерово, 650065, Российская Федерация

✉ Студенников Артем Евгеньевич; studennikovav@ficuuh.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Традиционные методы обнаружения иммуноглобулинов G (IgG) в сыворотке крови основаны на применении антител, химически конъюгированных с ферментными или флуоресцентными метками. Эффективность таких методов ограничивается стерическими помехами, возникающими в процессе химической конъюгации. В качестве альтернативы для иммунофлуоресцентного анализа IgG предложены бифункциональные гибридные белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 на основе Z-домена белка A *Staphylococcus aureus* и ярких флуоресцентных белков mHoneydew и CyOFP1, которые сочетают способность связываться с IgG и интенсивную флуоресценцию, а их получение исключает этап химической конъюгации.

ЦЕЛЬ. Получение гибридных белков на основе Z-домена белка A для создания универсальных флуоресцентных реагентов для обнаружения IgG в сыворотке крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Генетические конструкции *pCCO-Z-mHoneydew* и *pCCO-Z-CyOFP1* получали методами молекулярного клонирования в вектор pCCO. Экспрессию белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 (~35 кДа) проводили в *Escherichia coli* штамм M15. Белки очищали аффинной хроматографией на Ni²⁺-NTA агарозе. Свойства белков изучали с использованием спектрофлуориметрии, иммуоферментного анализа (ИФА) и иммунофлуоресцентного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Генетические конструкции *pCCO-Z-mHoneydew* и *pCCO-Z-CyOFP1* под контролем промотора T5 кодируют гибридные белки со следующей структурой: Z-домен белка A — гибкий линкер (Ser-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly) — флуоресцентный белок mHoneydew или CyOFP1 — гексагистидиновая метка. При экспрессии выход растворимых белков составил ~37 мг/л (Z-mHoneydew) и ~6 мг/л (Z-CyOFP1) с чистотой ≥90%. Максимумы возбуждения и эмиссии Z-mHoneydew зарегистрированы при длинах волн 480 и 536 нм соответственно со сдвигом эмиссии в синюю область на 26 нм относительно нативного mHoneydew (562 нм). Максимум возбуждения Z-CyOFP1 зарегистрирован при 515 нм со сдвигом в красную область на 18 нм относительно нативного CyOFP1 (497 нм) при сохранении максимума эмиссии. Методом ИФА показано дозозависимое связывание IgG с гибридными белками. Для Z-mHoneydew линейная зависимость наблюдалась в диапазоне концентраций от 30 до 235 нг/мкл ($R^2=0,96$), а для Z-CyOFP1 — от 15 до 250 нг/мкл ($R^2=0,97$), что подтверждает способность гибридных белков связываться с IgG. Данные иммунофлуоресцентного анализа указали на возможность обнаружения IgG, специфических к конъюгату бензо[а]пирена с бычьим сывороточным альбумином, в сыворотке крови кролика с использованием гибридных белков. Линейная зависимость для Z-mHoneydew наблюдалась в диапазоне разведений сыворотки 1:10–1:160 ($R^2=0,92$), а для Z-CyOFP1 —

1:10–1:80 ($R^2=0,98$), что свидетельствует о пригодности данных белков для обнаружения специфических антител в сыворотке крови.

ВЫВОДЫ. Гибридные белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 сохраняют флуоресцентные свойства и способность связываться с IgG, в том числе с IgG сыворотки крови, что перспективно с точки зрения разработки прототипов универсальных иммунофлуоресцентных тест-систем.

Ключевые слова: иммуноглобулин G; иммунофлуоресценция; иммуноанализ; ИФА; Z-домен белка A; *Staphylococcus aureus*; mHoneydew; CyOFP1; гибридные белки

Для цитирования: Елисейкин А.М., Маргатский И.В., Артемов В.Е., Марущак А.В., Понкратенко И.С., Глушков А.Н., Студенников А.Е. Бифункциональные гибридные белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 на основе Z-домена белка A *Staphylococcus aureus* для иммунофлуоресцентного анализа иммуноглобулинов G в сыворотке крови. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(2):196–207. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-746>

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР по теме государственного задания федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», Институт экологии человека, «Иммуно-гормональные взаимодействия при фиброзно-кистозной болезни молочной железы» (номер государственной регистрации 1023032300035-4-3.1.3).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Bifunctional hybrid proteins Z-mHoneydew and Z-CyOFP1 based on the Z-domain of *Staphylococcus aureus* protein A for immunofluorescence assay of immunoglobulins G in blood serum

Alexey M. Eliseykin , Ivan V. Margatskiy , Vladislav E. Artemov, Anna V. Marushchak , Igor S. Ponkratenko, Andrey N. Glushkov , Artem E. Studennikov 

Federal State Scientific Institute, Federal Research Centre for Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of Human Ecology, 10 Leningradsky Ave., Kemerovo 650065, Russian Federation

✉ Artem E. Studennikov; studennikovav@fciuh.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Traditional methods for detecting serum IgG rely on antibodies chemically conjugated to enzymatic or fluorescent tags. The efficiency of such methods may be limited by steric hindrance during chemical cross-linking. As an alternative, bifunctional hybrid proteins Z-mHoneydew and Z-CyOFP1, based on the Z-domain of *Staphylococcus aureus* protein A and bright fluorescent proteins mHoneydew and CyOFP1, combining the binding to IgG and intense fluorescence, have been proposed for IgG immunofluorescence analysis; their production excludes the stage of chemical conjugation.

AIM. This study aimed to produce hybrid proteins based on the Z-domain of protein A for the creation of universal fluorescent reagents for the detection of IgG in blood serum.

MATERIALS AND METHODS. The pCCO-Z-mHoneydew and pCCO-Z-CyOFP1 genetic constructs were created by molecular cloning in the pCCO vector. Z-mHoneydew and Z-CyOFP1 proteins (~35 kDa) were expressed in *Escherichia coli* strain M15. Protein purification was performed by affinity chromatography on Ni²⁺-NTA agarose. The protein properties were studied using spectrofluorimetry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and immunofluorescence assay.

RESULTS. Genetic constructs pCCO-Z-mHoneydew and pCCO-Z-CyOFP1 under the control of the T5 promoter encode chimeric proteins with the following structure: Z-domain of protein A –

flexible linker (Ser-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Ser-Gly) – fluorescent protein mHoneydew or CyOFP1 – 6×His tag. Soluble proteins were obtained with a yield of ~37 mg/L (Z-mHoneydew) and ~6 mg/L (Z-CyOFP1) with a purity ≥90%. For the Z-mHoneydew protein, excitation and emission maxima were observed at 480 and 536 nm, respectively; a 26 nm blue shift in emission was observed relative to native mHoneydew (562 nm). For Z-CyOFP1, the excitation maximum was recorded at 515 nm; an 18 nm red shift in excitation was observed relative to native CyOFP1 (497 nm), while maintaining the emission maximum. Dose-dependent binding of IgG to the hybrid proteins was demonstrated using ELISA. A linear dependence was observed for Z-mHoneydew in the concentration range of 30–235 ng/μL ($R^2=0.96$) and 15–250 ng/μL ($R^2=0.97$) for Z-CyOFP1, confirming the capacity of the hybrid proteins to bind IgG. Immunofluorescence assay showed the feasibility of detecting IgG, specific to conjugate benzo[a]pyrene-bovine serum albumin, in rabbit serum using hybrid proteins. A linear relationship was observed for Z-mHoneydew in the serum dilution range of 1:10–1:160 ($R^2=0.92$) and 1:10–1:80 ($R^2=0.98$) for Z-CyOFP1, evidencing the suitability of hybrid proteins for detection of specific antibodies in blood serum.

CONCLUSIONS. Hybrid proteins Z-mHoneydew and Z-CyOFP1 retain fluorescent properties and the capacity to bind to IgG, including serum IgG, which is promising from the point of view of developing prototypes of universal immunofluorescent test systems.

Keywords: immunoglobulin G; immunofluorescence; immunoassay; ELISA; Z-domain; protein A; *Staphylococcus aureus*; mHoneydew; CyOFP1; hybrid proteins

For citation: Eliseykin A.M., Margatskiy I.V., Artemov V.E., Marushchak A.V., Ponkratenko I.S., Glushkov A.N., Studennikov A.E. Bifunctional hybrid proteins Z-mHoneydew and Z-CyOFP1 based on the Z-domain of *Staphylococcus aureus* protein A for immunofluorescence assay of immunoglobulins G in blood serum. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(2):196–207. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-746>

Funding. This study was conducted by the Federal State Scientific Institute, Federal Research Centre for Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of Human Ecology as part of the research and development work under State Assignment No. 1023032300035-4-3.1.3.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из направлений совершенствования иммуноаналитических методов является разработка реагентов для селективного определения антител различных классов с использованием антиизотипических моноклональных или поликлональных антител, получаемых из гипериммунных сывороток крови животных или гибридных клеточных линий [1]. Получение таких антител – трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому возникает потребность в применении альтернативных реагентов с аналогичными функциями и более высокой стабильностью при меньших производственных затратах.

За последние два десятилетия внимание исследователей привлекают иммуноглобулин-связывающие белки патогенных микроорганизмов, такие как белки A, M и L [2], которые обладают природной способностью специфично связываться с определенными участками антител различных классов. Белок A, выделенный из *Staphylococcus aureus*, взаимодействует с Fc-фрагментом иммуноглобулина G (IgG) [3]; белок M – с Fc-фрагментом IgM; белок L – с κ-цепями Fab-фрагмента. Основные преимущества данных белков заключаются в универсальности,

высокой специфичности и простоте получения рекомбинантных вариантов в непатогенных организмах-продуцентах.

Наибольшее распространение в иммуноаналитических методах исследования, таких как вестерн-блоттинг и иммуоферментный анализ [4–6], получил белок A и его рекомбинантные варианты, в частности Z-домен, созданный на основе В-домена белка A *S. aureus* [7]. Z-домен состоит из 58 аминокислотных остатков, образует три антипараллельные α-спирали [8] и обладает аффинностью к Fc-участкам IgG [9]. Z-домен устойчив к протеазам и может быть экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Используя методы генной инженерии, можно создавать функциональные гибридные белки с Z-доменом [10, 11].

Применение Z-домена в качестве универсального реагента в иммуноанализе [12, 13] подразумевает его конъюгацию с ферментными метками, такими как щелочная фосфатаза или пероксидаза хрена (HRP). Данные ферменты усиливают аналитический сигнал при использовании соответствующих субстратов. Однако ферментные метки имеют следующие недостатки: необходимость применения специфических субстратов, что усложняет и удорожает анализ;

потеря активности при неправильном хранении; снижение эффективности связывания и чувствительности анализа из-за крупных размеров ферментов. Также исследователи часто обращаются к альтернативным системам обнаружения, основанным на флуоресцентных метках [14]. Использование химических флуорофоров позволяет напрямую детектировать флуоресцентный сигнал меченого белка без применения субстратов; кроме того, они стабильны и пригодны для мультиплексных форматов анализа. Тем не менее традиционные методы химической конъюгации таких меток имеют недостатки вследствие того, что требуются дополнительные реагенты и большое количество белка, а также существует риск нарушения функций белка из-за неспецифического присоединения меток [15].

Одним из возможных путей устранения указанных недостатков является создание рекомбинантных гибридных белков для иммуноанализа [16]. Гибридные белки могут объединять несколько функциональных доменов при сохранении их свойств [17]. Особый интерес представляют генетические конструкции, кодирующие гибридные белки, содержащие естественные флуорофоры, например GFP-подобные белки [18]. Комбинирование естественных флуорофоров в качестве меток с белком-носителем без потери его функциональности делает такие конструкции перспективными для биомедицинских исследований и иммуноанализа [19]. В качестве еще одного преимущества стоит отметить стабильность флуоресцентного сигнала. Это позволяет проводить иммунофлуоресцентный анализ с получением воспроизводимых результатов. Разнообразие флуоресцентных белков дает возможность создавать мультиплексные системы [20]. Несмотря на потенциальные преимущества Z-домена для создания рекомбинантных флуоресцентных конструкций, аспекты разработки стабильных диагностических тест-систем на их основе для обнаружения сывороточных антител остаются малоизученными.

В литературе недостаточно данных о применении подобных рекомбинантных белков для количественного определения сывороточных IgG. Так, были найдены два исследования, посвященные использованию Z-домена, меченого флуоресцентными белками, преимущественно в микроскопии [21, 22]; данные о разработках мультиплексных систем с использованием меченого флуоресцентными белками Z-домена не обнаружены.

В свою очередь, использование различных флуоресцентных белков с уникальными спектральными характеристиками в качестве меток

дает возможность одновременно применять флуоресцентно-меченный Z-домен в одной пробе с другими мечеными конъюгатами. Создание универсального в применении флуоресцентного реагента для обнаружения целевых IgG в сыворотке крови значительно упростит и удешевит иммуноанализ, позволит повысить его воспроизводимость и откроет возможности для разработки прототипов тест-систем.

Цель работы — получение гибридных белков на основе Z-домена белка А для создания универсальных флуоресцентных реагентов для обнаружения IgG в сыворотке крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы сыворотки крови

Гипериммунные сыворотки крови кроликов, которых иммунизировали отдельными конъюгатами полициклических ароматических углеводов с бычьим сывороточным альбумином (ПАУ-БСА), получены ранее в нашей лаборатории в соответствии с протоколом, описанным в работе [23]. Сыворотки, содержащие поликлональные антитела к конъюгатам ПАУ-БСА, хранили при 4 °С с добавлением натрия азида до финальной концентрации 0,02%. В экспериментах использовали образец сыворотки крови кролика, иммунизированного конъюгатом бензо[а]пирена с БСА (БП-БСА) [24].

Сборка плазмидных конструкций для экспрессии Z-mHoneydew и Z-CyOFP1

Гены, кодирующие mHoneydew и CyOFP1, были амплифицированы методом ПЦР с использованием ДНК-полимеразы PfuSe (НПО «СибЭнзим», Россия). В качестве матриц использовали коммерчески доступные плазмидные ДНК pNCS-mHoneydew и pKK-TEV-CyOFP1 (Addgene, США).

Для амплификации генов mHoneydew (696 п.н.) и CyOFP1 (702 п.н.), кодирующих белки с молекулярными массами 26,2 и 26,3 кДа соответственно, использовали праймеры F-mHondew g-s и R-mHondw6his (табл. 1). ПЦР-продукты mHoneydew и CyOFP1 обрабатывали эндонуклеазами BamHI и HindIII (НПО «СибЭнзим») в соответствии с протоколом производителя. Ген Z (171 п.н.), кодирующий Z-домен белка А массой 6,5 кДа, амплифицировали с использованием праймеров F-Za и R-Za (табл. 1). В качестве матрицы использовали плазмиду pEZZ18 (Amersham, США). ПЦР-продукт гена Z обрабатывали эндонуклеазами Bsp19I и BamHI.

Плазмиду pCCO линеаризовали рестриктазами Bsp19I и HindIII. Продукты рестрикции — гены Z, mHoneydew и CyOFP1 — лигировали с вектором pCCO в присутствии T4-лигазы (НПО «СибЭнзим»)

Таблица 1. Праймеры для ПЦР амплификации генов и генетических конструкций
Table 1. Primer sequences for PCR amplification of genes and genetic constructs

Праймеры <i>Primers</i>	Последовательности праймеров <i>Primer sequences</i>	Рестриктазы <i>Restrictases</i>
F-mHondew g-s	5'-GAATT <u>TCGGGATCC</u> AGTAGTGGAGTGAGCAAGGGCGAG-3'	<i>Bam</i> HI
R-mHondw6his	5'-AATAAAGCTTAGTGGTGGTGATGATGATGTGACTTGTACAGCTCGTCC-3'	<i>Hind</i> III
F-Za	5'-CACGATGAAGCCATGGACAACAAATTCACAAAG-3'	<i>Bsp</i> 19I
R-Za	5'-CG <u>GGATCC</u> GAGCTCGAATTCGCG-3'	<i>Bam</i> HI
CBD-F	5'-CACGAGGCCCTTTCGTCTTACC-3'	Нет / <i>No</i>
R-T0term	5'-GCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAG-3'	Нет / <i>No</i>

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

Примечание. Праймеры F-mHondew g-s и R-mHondw6his: сайты рестрикции *Bam*HI и *Hind*III выделены подчеркиванием, участки линкера (Ser 3 Gly)2, а также последовательность 6×His-метки отмечены серым цветом. Праймеры F-Za и R-Za: сайты рестрикции *Bsp*19I и *Bam*HI выделены подчеркиванием, участок (Ser 3 Gly)2 линкера отмечен серым цветом.

Note. Primers F-mHondew g-s and R-mHondw6his: *Bam*HI and *Hind*III restriction sites are underlined with bold lines, the linker regions (Ser 3 Gly)2, and the 6×His-tag sequence are highlighted in gray. Primers F-Za and R-Za: *Bsp*19I and *Bam*HI restriction sites are underlined with bold lines, the (Ser 3 Gly)2 linker region are highlighted in gray.

в соотношениях 1:1,5:1,5 для *pCCO:Z-mHoneydew* и 1:1,5:1,5 – *pCCO:Z-CyOFP1*. Полученные плазмидные конструкции *pCCO-Z-mHoneydew* и *pCCO-Z-CyOFP1* проверяли ПЦР (праймеры CBD-F и R-mHondw6his). Дополнительно проводили секвенирование с использованием набора BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США) и праймеров CBD-F и R-T0term (табл. 1).

Трансформацию плазмидных конструкций в *E. coli* штамм M15 осуществляли методом электропорации (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad) при следующих условиях: кювета с зазором между электродами – 0,1 см; напряжение – 1800 В; емкость – 25 мкФ; сопротивление – 200 Ом; время продолжительности импульса – от 5 до 5,2 мс.

Экспрессия и очистка Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 из *E. coli*

Бактериальные штаммы *E. coli* M15, экспрессирующие Z-mHoneydew и Z-CyOFP1, высевали на агаризованную среду LB, содержащую 150 и 50 мкг/мл ампициллина и канамицина соответственно, и культивировали в течение 16 ч при 37 °С. Отобранными колониями инокулировали 5 мл бульона LB с добавлением тех же антибиотиков и выращивали в течение 16 ч при 37 °С и перемешивании при скорости 125 об/мин. Суспензионную культуру переносили в 1,5 л среды LB, содержащую антибиотики, инкубировали при 37 °С и скорости 125 об/мин до достижения значения оптической плотности суспензии 0,5 при длине волны 600 нм. Экспрессию белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 индуцировали

добавлением изопропил β-D-тиогалактозида (ООО «Компания Хеликон», Россия) до конечной концентрации 1 мМ. После индукции культивирование продолжали в тех же условиях в течение 16 ч.

Клеточную биомассу собирали центрифугированием при 2000 *g* в течение 20 мин при 4 °С и промывали охлажденным фосфатно-солевым буферным раствором, ФСБР (pH 7,5). Осадок ресуспендировали в 10 мл лизирующего буферного раствора, содержащего 30 мМ Na₂HPO₄ (pH 8,0), 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, и разрушали ультразвуком (Sonics Vibracell, США) на льду. Растворимую фракцию выделяли путем центрифугирования при 14000 об/мин (ротатор 45 Ti, центрифуга Optima L-90K, Beckman Coulter, США) в течение 20 мин при 4 °С. Супернатант наносили на колонку, содержащую 2 мл Ni²⁺-NTA агарозы (Serva, США), предварительно уравновешенную лизирующим буферным раствором. Смола промывали 10 мл буферного раствора, содержащего 50 мМ Na₂HPO₄ (pH 6,0), 300 мМ NaCl, 40 мМ имидазол и 10% глицерин. Белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 элюировали буферным раствором, содержащим 50 мМ Na₂HPO₄ (pH 6,0), 300 мМ NaCl, 150 мМ имидазола и 10% глицерин. Полученные фракции диализовали против ФСБР и анализировали методом электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ)¹.

Количественное определение белка в очищенных препаратах проводили с использованием набора Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США).

¹ Студенников АЕ. Антитела к полициклическим ароматическим углеводородам и антиидиотипические антитела к ним: получение, характеристика, применение: дис. ... канд. биол. наук. Кемерово; 2022.

Флуоресцентные свойства гибридных белков исследовали с использованием мультимодального микропланшетного ридера ClarioStar Plus (BMG Labtech, Германия). Рабочие растворы белков готовили путем 1000-кратного разведения очищенных препаратов в ФСБР до финальной концентрации 1 нг/мкл. Методом последовательных двукратных разведений тем же буфером получали пять тестовых образцов с концентрациями 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 и 1 нг/мкл. Далее аликвоты полученных растворов объемом 200 мкл вносили в лунки черного 96-луночного планшета (Greiner Bio-One, Германия). Измерения проводили в режиме сканирования с регистрацией спектров возбуждения и эмиссии в диапазоне от 340 до 740 нм. Для каждого белка определяли спектры возбуждения при фиксированной длине волны эмиссии, спектры эмиссии при фиксированной длине волны возбуждения и оптимальные пары длин волн возбуждения/эмиссии. Все измерения выполняли при 25 °С в ФСБР ($n=3$). В качестве фонового контроля использовали лунки с ФСБР.

Связывание Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 с иммуноглобулинами G

Связывающую способность гибридных белков с IgG изучали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием очищенных козьих антикроличьих IgG, конъюгированных с HRP (Abcam, США). В лунки 96-луночного иммунологического планшета вносили по 100 мкл растворов белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 в начальных концентрациях 470 и 250 нг/мкл соответственно с последующим серийным разведением в ФСБР, после чего инкубировали в течение 1 ч и 500 об/мин при 37 °С.

Для предотвращения неспецифического связывания поверхность лунок обрабатывали 250 мкл «блокирующим раствором» ФСБР, содержащим 1% БСА (Amresco, США) и 0,05% Tween-20 (ООО «Компания Хеликон»), в течение 1 ч при 37 °С. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора очищенных HRP-меченных козьих антикроличьих IgG (разведение 1:2500 в блокирующем растворе) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С при перемешивании. После инкубации лунки планшета 4 раза промывали 300 мкл ФСБР, содержащим 0,05% Tween-20 с использованием автоматической промывочной станции Bio-Plex Pro Wash Station (Bio-Rad, США). Далее в лунки вносили по 50 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma-Aldrich, США) и через 10 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М HCl.

Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 450 нм с использованием планшетного ридера iMark (Bio-Rad). В качестве контроля неспецифического связывания использовали лунки без сорбированных гибридных белков.

Связывание Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 с иммуноглобулинами G сыворотки крови

Способность Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 связываться с IgG оценивали методом иммунофлуоресцентного анализа. В качестве антигена использовали БП-БСА. В лунки черного 96-луночного планшета вносили по 200 мкл раствора конъюгата в ФСБР (5 нг/мкл). Планшет инкубировали в течение 16 ч при 25 °С в месте, полностью защищенном от света. После удаления раствора БП-БСА вносили блокирующий раствор в объеме 250 мкл и инкубировали в течение 1 ч и 500 об/мин при 37 °С. Затем в лунки вносили 200 мкл серийных разведений иммунной сыворотки кролика. В эксперименте использовали один аликвотный образец сыворотки крови кролика, иммунизированного конъюгатом БП-БСА. Цельную сыворотку крови последовательно разводили ФСБР с шагом в два раза, начиная с разведения 1:10 и заканчивая разведением 1:320. Инкубацию с сывороткой проводили в течение 1 ч и 500 об/мин при 37 °С. После этого лунки 4 раза промывали 300 мкл ФСБР, содержащим 0,05% Tween-20, с использованием автоматической промывочной станции Bio-Plex Pro Wash Station. Для оценки фонового сигнала использовали контрольные лунки двух типов: с иммобилизованным антигеном (без сыворотки) и без антигена и сыворотки (только блокирующий раствор). Для выявления связавшихся антител в лунки добавляли 200 мкл раствора белка Z-mHoneydew или Z-CyOFP1 в концентрации 100 нг/мкл каждый и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С при перемешивании. После завершения инкубации лунки 4 раза промывали 200 мкл ФСБР, содержащим 0,05% Tween-20. Флуоресцентный сигнал белков регистрировали на мультимодальном микропланшетном ридере ClarioStar Plus (BMG Labtech, Германия) при 25 °С: Z-mHoneydew — длина волны возбуждения 481 нм и эмиссии 538 нм; Z-CyOFP1 — длина волны возбуждения 514 нм и эмиссии 590 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сборка генетических конструкций Z-mHoneydew и Z-CyOFP1

Ген Z-домена белка A и гены флуоресцентных белков mHoneydew [25] и CyOFP1 [26] амплифицировали методом ПЦР. После очистки ПЦР-продукты были клонированы в плазмидный

вектор pCCO [27] под контролем промотора T5. Плазмидные конструкции содержали гены, кодирующие Z-домен и флуоресцентные белки, соединенные линкером, который кодирует пептид Ser-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Ser-Gly, обозначенный как (Ser3Gly)₂ (рис. 1А). Корректность сборки генетических конструкций pCCO-Z-mHoneydew и pCCO-Z-CyOFP1 подтверждали секвенированием генов плазмидных конструкций и ПЦР-анализом плазмидных конструкций с последующим электрофоретическим разделением ПЦР-продуктов — генетических вставок. Размеры генетических вставок Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 находились в диапазоне от 1000 до 1500 п.н. (рис. 1В), что согласуется с теоретически предсказанными значениями 1077 и 1071 п.н. для Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 соответственно. Окончательную проверку сборки плазмидных конструкций провели путем секвенирования целевых генов. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с расчетными подтвердило корректность сборки конструкций, а именно: вставки имели правильную ориентацию, не содержали делеций и инсерций, рамка считывания сохранялась.

Экспрессия и очистка белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1

Из культуры объемом 1 л среды LB получено ~37 мг белка Z-mHoneydew с чистотой ~90% по данным денситометрического анализа ДСН-ПААГ и ~6 мг Z-CyOFP1 с чистотой ≥90%. Гибридные белки имели молекулярную массу около 35 кДа (рис. 2), что соответствует теоретически предсказанным значениям 34,7 и 34,9 кДа для Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 соответственно.

Изучение флуоресцентных свойств Z-mHoneydew и Z-CyOFP1

Изучение флуоресцентных свойств гибридных белков включало следующие этапы: измерение интенсивности флуоресценции при различных концентрациях белка (серийные разведения) и сканирующей спектрофлуориметрии в диапазоне от 340 до 740 нм для определения оптимальных длин волн возбуждения и эмиссии. Измерения для каждого разведения проводили в трех повторах. Полученные при сканировании гибридного белка Z-mHoneydew данные (рис. 3А) сравнивали с известными данными сканирования нативного белка mHoneydew, спектральные

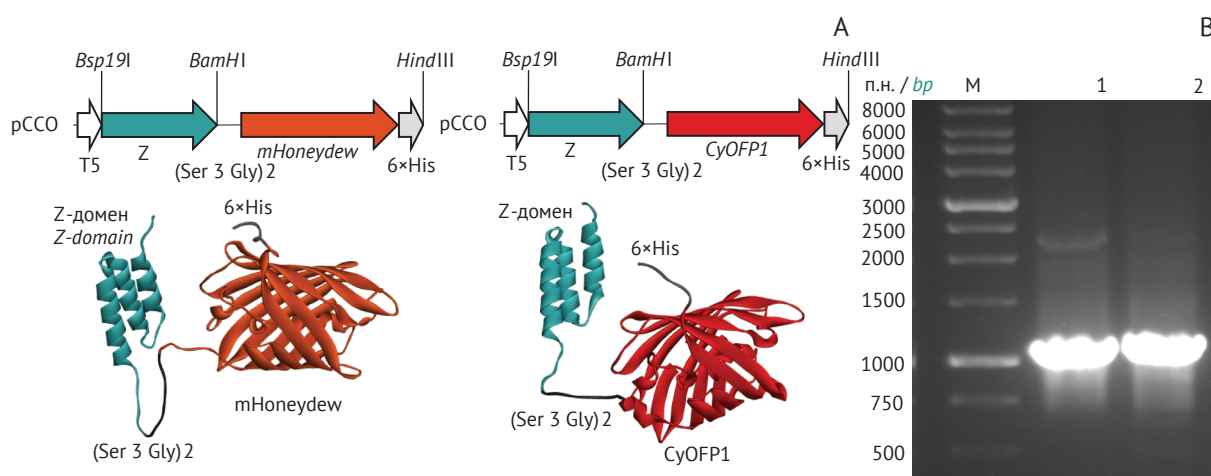


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 1. А — схема плазмидных конструкций pCCO-Z-mHoneydew и pCCO-Z-CyOFP1: T5 — промотор; ген Z кодирует домен белка А, который связывает иммуноглобулин G; mHoneydew — ген кодирует оранжевый флуоресцентный белок; 6xHis — гексистицидиновая метка на С-конце белка; (Ser 3 Gly)₂ — гибкий линкер; CyOFP1 — ген кодирует красный флуоресцентный белок. На 3D-моделях, предсказанных AlphaFold², Z-домен представлен тремя альфа-спиралями и соединен посредством гибкого линкера с глобулой белка CyOFP1 или mHoneydew. В — электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов в 1% агарозном геле: М — маркер размера фрагментов ДНК; 1 — ПЦР-продукт гена Z-CyOFP1, 1071 п.н.; 2 — ПЦР-продукт гена Z-mHoneydew, 1077 п.н.; п.н. — пар нуклеотидов.

Fig. 1. A, a scheme of pCCO-Z-mHoneydew and pCCO-Z-CyOFP1 plasmid constructs: T5, promoter; Z, a gene encodes the synthetic IgG-binding Z-domain of protein A; mHoneydew, a gene encodes an orange fluorescent protein; 6xHis, C-terminal hexahistidine tag; (Ser 3 Gly)₂, flexible linker; CyOFP1, a gene encodes a red fluorescent protein. In the 3D-models, predicted by AlphaFold², Z-domain is represented by three alpha-helices and is connected via a flexible linker to the CyOFP1 or mHoneydew globule. B, electrophoretic separation of PCR-products in a 1% agarose gel: M, molecular weight size marker; 1, PCR-product of the Z-CyOFP1 gene, 1071 bp; 2, PCR-product of the Z-mHoneydew gene, 1077 bp.; bp, base pairs.

² <https://alphafoldserver.com>

³ Там же.

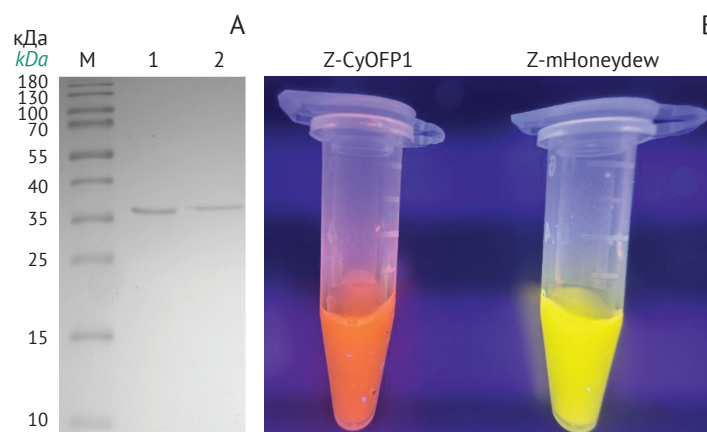


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Идентификация очищенных гибридных белков: А — электрофоретический анализ Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 в 12,5% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия: М — маркер молекулярных масс; 1 — Z-CyOFP1; 2 — Z-mHoneydew; В — флуоресценция очищенных белковых препаратов Z-CyOFP1 и Z-mHoneydew в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм.

Fig. 2. Identification of purified hybrid proteins. A, electrophoretic analysis of Z-mHoneydew and Z-CyOFP1 in a 12.5% polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate: M, molecular weight marker; 1, Z-CyOFP1; 2, Z-mHoneydew. B, fluorescence of the purified protein preparations of Z-CyOFP1 and Z-mHoneydew under ultraviolet light exposure at a wavelength of 365 nm.

характеристики которого взяты из открытой базы данных Fluorescent protein database⁴: максимумы возбуждения и эмиссии mHoneydew наблюдаются при длинах волн 480 и 562 нм соответственно. На рисунке 3А показано, что Z-mHoneydew при pH 7,5 имеет совпадающий максимум возбуждения при 480 нм, однако наблюдается сдвиг максимума эмиссии от 562 к 536 нм по сравнению с нативным mHoneydew. Сдвиг наблюдается и при более низких концентрациях белка Z-mHoneydew. При использовании Z-mHoneydew в качестве флуоресцентной метки в иммуноанализе детекцию сигнала можно проводить при длине волны 536 нм.

На рисунке 3В показано сравнение спектральных характеристик гибридного белка Z-CyOFP1 при pH 7,5 с данными спектральных характеристик нативного CyOFP1, взятых из Fluorescent protein database: максимумы возбуждения и эмиссии наблюдаются при 497 и 588 нм соответственно. Из рисунка видно, что максимум возбуждения Z-CyOFP1 смещается в длинноволновую область от 497 к 515 нм. Подобный сдвиг имеет место и при более низких концентрациях белка, но максимум эмиссии Z-CyOFP1 и CyOFP1 остается при длине волны 588 нм. Наблюдаемые сдвиги спектров возбуждения и эмиссии гибридных белков предположительно обусловлены влиянием относительно небольшого Z-домена на конформацию β -бочонка флуоресцентного белка, формирующего

микроокружение хромофора. Выбор длины волны 515 нм возбуждения является оптимальным для иммунофлуоресцентного анализа с использованием Z-CyOFP1.

Изучение связывания Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 с IgG методом иммуноферментного анализа

Поскольку Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 содержат Z-домен белка А в дополнение к флуоресцентным белкам, необходимо проверить их способность связываться с IgG. Взаимодействие изучали методом прямого ИФА в трех независимых повторях. В лунки иммунологического планшета вносили серийные разведения гибридных белков, после чего добавляли очищенные HRP-меченные козы антикроличьи IgG. Меченые антитела дозозависимо связывались с обоими белками (рис. 4). Линейная зависимость связывания наблюдается для Z-mHoneydew в диапазоне от 30 до 235 нг/мкл, для Z-CyOFP1 — от 15 до 250 нг/мкл. Высокие значения коэффициентов детерминации 0,97 (Z-mHoneydew) и 0,96 (Z-CyOFP1) указывают на хорошее качество аппроксимации и демонстрируют зависимость сигнала ИФА от концентрации гибридных белков.

Изучение связывания Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 с IgG сыворотки крови методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа

Для обнаружения IgG с использованием флуоресцентно-меченных гибридных белков

⁴ <https://www.fpbse.org>

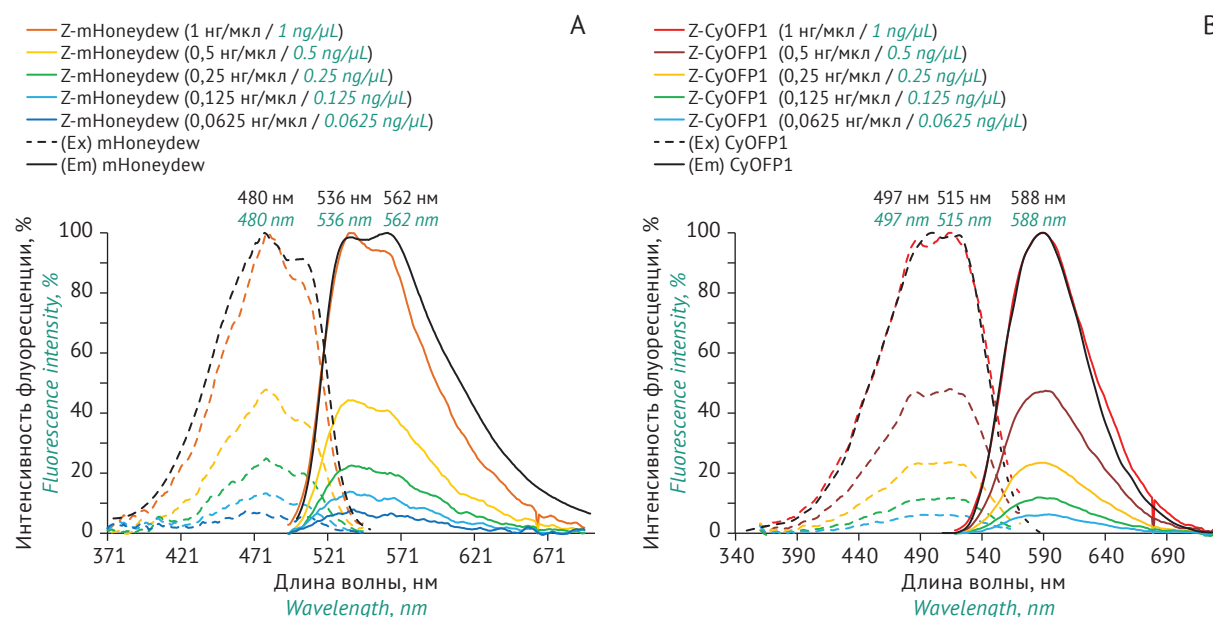


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Спектральные характеристики гибридных белков: А – Z-mHoneydew в диапазоне концентраций от 0,0625 до 1 нг/мкл, максимумы возбуждения и эмиссии при длинах волн 480 и 536 нм соответственно; В – Z-CyOFP1 в диапазоне концентраций от 0,0625 до 1 нг/мкл, максимумы возбуждения и эмиссии при длинах волн 515 и 588 нм соответственно. Черными линиями показаны референсные спектры нативных белков mHoneydew или CyOFP1. Данные представлены как среднеарифметические значения; все измерения проводили в трех повторностях.

Fig. 3. Spectral characteristics of hybrid proteins. A, Z-mHoneydew in the concentration range from 0.0625 to 1 ng/μL, excitation and emission maxima at wavelengths of 480 and 536 nm, respectively. B, Z-CyOFP1 in the concentration range from 0.0625 to 1 ng/μL, excitation and emission maxima at wavelengths of 515 and 588 nm, respectively. The black lines show the reference spectra of native CyOFP1 or mHoneydew. Data are presented as mean values; all measurements were performed in triplicate.

в лунки с сорбированным конъюгатом БП-БСА вносили образцы сыворотки крови иммунизированных кроликов в разных разведениях. После инкубации добавляли Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 и измеряли сигналы флуоресценции в трех независимых наблюдениях. Изменение интенсивности флуоресценции коррелировало с разведением сыворотки, что отражало наличие IgG, специфических к БП-БСА (рис. 5). В контрольных лунках планшета, блокированных БСА и содержащих сорбированный антиген, но без добавления сыворотки, флуоресцентный сигнал соответствовал фоновым значениям. Фоновый сигнал составил 2316 относительных единиц (отн. ед.) флуоресценции при длинах волн 480 нм (возбуждение) и 536 нм (эмиссия) для Z-mHoneydew. Фоновый сигнал составил 2568 отн. ед. флуоресценции при длинах волн 515 нм (возбуждение) и 588 нм (эмиссия) для Z-CyOFP1.

Представленные на рисунке 5 величины были скорректированы путем вычитания значений фонового сигнала контрольных лунок. Для проверки неспецифического взаимодействия гибридных белков с БСА получены значения фонового сигнала блокированных БСА лунок

планшета, не содержащих сорбированный антиген и сыворотку: для Z-mHoneydew флуоресцентный сигнал составил 2730 отн. ед. флуоресценции при длинах волн возбуждения 480 нм и эмиссии 536 нм; для Z-CyOFP1 – 2601 отн. ед. флуоресценции при длинах волн возбуждения 515 нм и эмиссии 588 нм. Наблюдалась четкая зависимость интенсивности флуоресценции от разведения сыворотки (рис. 5), отражающая содержание IgG, специфических к БП-БСА. Данные иммунофлуоресцентного анализа подтвердили возможность обнаружения IgG в модельной системе с использованием гибридных белков. Аппроксимация данных позволила выявить участок линейной зависимости в диапазоне разведений сыворотки 1:10–1:160 (Z-mHoneydew) и 1:10–1:80 (Z-CyOFP1). Данные указывают на свойство белков к обнаружению специфических IgG в сыворотке крови.

Таким образом, слияние с Z-доменом не приводит к потере флуоресцентных характеристик mHoneydew и CyOFP1. Свойство изученных гибридных белков связывать IgG позволяет рассматривать их в качестве перспективных детектирующих реагентов в флуоресцентном иммуноанализе.

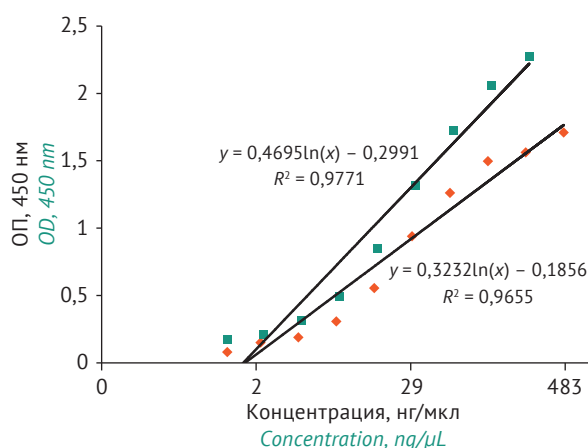


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Кривые связывания иммобилизованных белков Z-mHoneydew (ромбы) и Z-CyOFP1 (квадраты) с козьими иммуноглобулинами G, меченными пероксидазой хрена, по данным иммуноферментного анализа. ОП — оптическая плотность. Ось X — концентрации белков Z-mHoneydew или Z-CyOFP1. Эксперименты выполнены в трех независимых повторях; данные на графике представлены в виде среднеарифметических значений. Каждая экспериментальная точка скорректирована на величину фонового сигнала в контрольных лунках (ОП₄₅₀=0,042).

Fig. 4. Binding curves of immobilized proteins Z-mHoneydew (diamonds) and Z-CyOFP1 (squares) with goat immunoglobulin G labeled with horseradish peroxidase, as determined by enzyme-linked immunosorbent assay. OD, optical density. X-axis, concentration of Z-mHoneydew or Z-CyOFP1. Experiments were performed in three independent replicates; data on the graph are presented as mean values. Each experimental point was corrected for the background signal in control wells (OD₄₅₀=0.042).

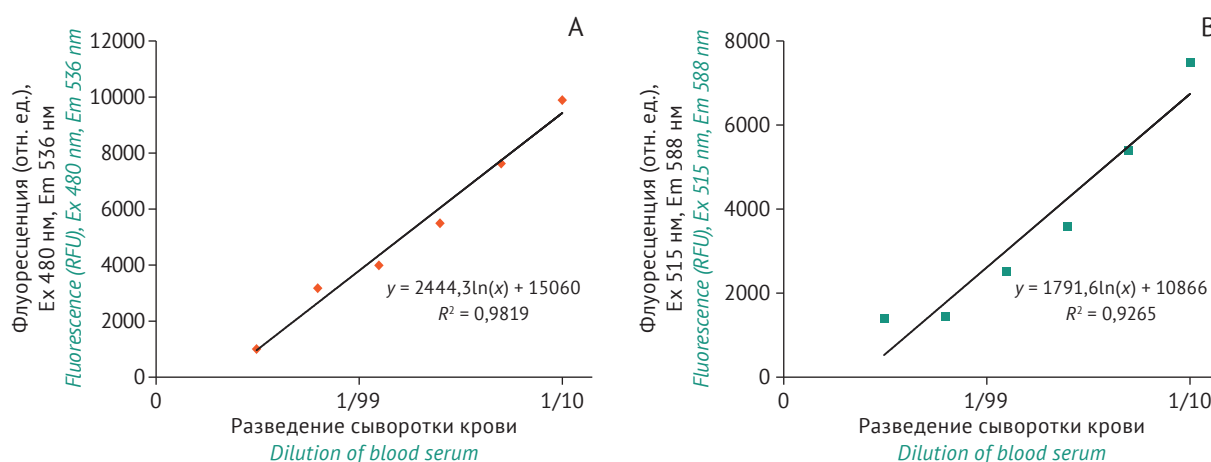


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Кривые связывания гибридных белков с сывороточными IgG, специфичными к конъюгату бензо[а]пирена с бычьим сывороточным альбумином по данным иммунофлуоресцентного анализа: А — Z-mHoneydew (ромбы) и В — Z-CyOFP1 (квадраты). Ex и Em — длина волны возбуждения и эмиссии соответственно. Данные представлены как средние арифметические значения (n=3), скорректированные на фоновый сигнал.

Fig. 5. Binding curves of fusion proteins with serum IgG specific for benzo[a]pyrene-bovine serum albumin conjugate according to immunofluorescence assay. A, Z-mHoneydew (diamonds) and B, Z-CyOFP1 (squares). Abbreviations: RFU, relative fluorescence units. Data are presented as the arithmetic mean values (n=3), corrected for background signal.

ОБСУЖДЕНИЕ

Создание гибридных белков, которые выполняют связывающие и детектирующие функции, является перспективным направлением в молекулярной иммунологии. Наша работа показывает, что Z-домен белка A *S. aureus* может быть успешно использован в качестве основы для создания флуоресцентных реагентов при обнаружении IgG. Экспериментально подтверждена способность гибридных белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 специфически взаимодействовать с очищенными HRP-мечеными IgG и поликлональными IgG сыворотки крови. Белки сохраняют флуоресцентные свойства, демонстрируя лишь незначительные спектральные сдвиги относительно исходных флуоресцентных белков. Результаты дополнительных экспериментов указывают на отсутствие нарушений в пространственной структуре обоих доменов в составе сконструированных белков. Полученные гибридные белки сочетают неизменную специфичность Z-домена к IgG с флуоресцентными свойствами. Подобные белки упомянуты в ограниченном числе публикаций, например в контексте создания люциферазных гибридных белков на основе Z-домена [28]. Следует отметить, что и рекомбинантные флуоресцентные конструкции, аналогичные разрабатываемым, были ранее описаны в литературе [29]. Несмотря на имеющиеся аналоги, меченные EGFP (enhanced green fluorescent protein), ключевым отличием нашей работы является целенаправленное конструирование рекомбинантных реагентов, отличающихся универсальностью

и адаптивностью, для определения сывороточных IgG иммунофлуоресцентным методом.

Помимо детекции IgG, специфичных к различным антигенам, созданные иммунореагенты позволяют регистрировать сигнал иммунных комплексов. В частности, ключевым преимуществом гибридного белка Z-mHoneydew является широкий спектральный диапазон 481–507 нм (возбуждение) и 536–562 нм (эмиссия). Использование mHoneydew в качестве метки открывает возможности для детекции антител по флуоресцентному сигналу на оборудовании с разными оптическими конфигурациями за счет широких диапазонов возбуждения/эмиссии флуоресцентного белка. Параллельно создан рекомбинантный белок Z-CyOFP1, который в перспективе может быть использован в FRET-анализе (Förster resonance energy transfer). Флуоресцентный белок CyOFP1 в составе рекомбинантного гибридного белка Z-CyOFP1 может служить эффективным флуорофором-акцептором, что в комбинации с подходящим флуорофором-донором позволит изучать динамику формирования иммунных комплексов [30, 31].

Исследование имеет ряд ограничений. Основным подтверждением функциональности Z-домена белка A в составе гибридных белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 послужили данные о взаимодействии с очищенными HRP-мечеными IgG и поликлональными IgG в сыворотке крови кроликов, иммунизированных антигеном БП-БСА. Однако остается не охарактеризованной аффинность взаимодействий (равновесные константы диссоциации) комплексов созданных гибридных белков с IgG, что затрудняет постановку количественного

иммунофлуоресцентного анализа. Кроме того, не изучена стабильность белков при различных условиях хранения (температура, pH, циклы замораживания-оттаивания) и структурная целостность белков в динамике, что напрямую определяет воспроизводимость и надежность анализа. Еще одно ограничение заключается в том, что гибридные белки не апробированы на сыворотках крови человека; это не позволяет оценить их реальную диагностическую ценность.

В перспективе авторы планируют провести анализ диагностической эффективности на клинических образцах сывороток в условиях реальной диагностической задачи.

ВЫВОДЫ

1. Получены два гибридных белка на основе Z-домена белка A для создания универсальных флуоресцентных реагентов при обнаружении IgG.
2. Изучены спектры возбуждения и эмиссии гибридных белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1.
3. Белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 взаимодействуют с очищенными HRP-мечеными IgG и поликлональными IgG, специфичными к конъюгату бензо[а]пирена с бычьим сывороточным альбумином в сыворотке крови иммунизированных кроликов. Гибридные белки сохраняют флуоресцентные свойства относительно исходных флуоресцентных белков в иммуноанализе. Сочетание таких характеристик позволит в дальнейшем использовать Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 в количественном иммунофлуоресцентном анализе, открывая новые возможности для создания прототипов универсальных и высокочувствительных диагностических тест-систем.

Литература/References

1. Ghagane S, Puranik S, Gan S, et al. Frontiers of monoclonal antibodies: Applications in medical practices. *Hum Antibodies*. 2017;26(3):135–42. <https://doi.org/10.3233/HAB-170331>
2. Sidorin E, Solov'eva T. IgG-binding proteins of bacteria. *Biochemistry (Moscow)*. 2011;76(3):295–308. <https://doi.org/10.1134/s0006297911030023>
3. Cruz A, Boer M, Strasser J, et al. Staphylococcal protein A inhibits complement activation by interfering with IgG hexamer formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021;118(7):e2016772118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016772118>
4. Goding J. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J Immunol Methods*. 1978;(20):241–53. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(78\)90259-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(78)90259-4)
5. Bao L, Yang A, Liu Z, et al. Development of a mammalian cell-based ZZ display system for IgG quantification. *BMC Biotechnol*. 2023;23(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s12896-023-00798-2>
6. Девдариани ЗЛ, Терешкина НЕ, Тараненко ТМ и др. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*). Проблемы особо опасных инфекций. 2013;(1):74–7. Devdariani ZL, Tereshkina NE, Taranenko TM, et al. Results of modeling experiments in designing immune-enzyme test-system for the detection of antibodies to *Yersinia pestis* F1 (ELISA-Ab-F1 *Yersinia pestis*). *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2013;(1):74–7 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-1-74-77>
7. Mazigi O, Schofield P, Langley D, Christ D. Protein A superantigen: structure, engineering and molecular basis of antibody recognition. *Protein Eng Des Sel*. 2019;32(8):359–66. <https://doi.org/10.1093/protein/gzz026>
8. Braisted A, Wells J. Minimizing a binding domain from protein A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(12):5688–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5688>
9. Tashiro M, Tejero R, Zimmerman D, et al. High-resolution solution NMR structure of the Z domain of staphylococcal protein A. *J Mol Biol*. 1997;272(4):573–90. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1265>
10. Le Brun A, Shah D, Athey D, et al. Self-assembly of protein monolayers engineered for improved monoclonal immunoglobulin G binding. *Int J Mol Sci*. 2011;12(8):5157–67. <https://doi.org/10.3390/ijms12085157>
11. Viviani V, Silva J, Ho P. A novel brighter bioluminescent fusion protein based on ZZ domain and *Amydetes vivianii* firefly luciferase for immunoassays. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:755045. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.755045>
12. Park J, Kim M, Jose J, Park M. Covalently immobilized regenerable immunoaffinity layer with orientation-controlled antibodies based on Z-domain autodisplay. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1):459. <https://doi.org/10.3390/ijms23010459>
13. Jeon D, Pyun J, Jose J, Park M. A regenerative immunoaffinity layer based on the outer membrane of Z-domains autodisplaying *E. coli* for immunoassays and immunosensors. *Sensors (Basel)*. 2018;18(11):4030. <https://doi.org/10.3390/s18114030>

14. Hajdu T, Rebenku I, Serrano Cano T, et al. Fluorescence labeling-induced structural rearrangement of a monoclonal IgG revealed by biophysical experiments and simulations. *Int J Biol Macromol*. 2025;321(Pt 2):146209. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146209>
15. Witting E, Hober S, Kanje S. Affinity-based methods for site-specific conjugation of antibodies. *Bioconjug Chem*. 2021;32(8):1515–24. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00313>
16. Ji P, Wang K, Zhang L, et al. A new nanobody-enzyme fusion protein-linked immunoassay for detecting antibodies against influenza A virus in different species. *J Biol Chem*. 2022;298(12):102709. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102709>
17. Yu K, Liu C, Kim B, Lee D. Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnol Adv*. 2015;33(1):155–64. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.005>
18. Nienhaus K, Nienhaus G. Genetically encodable fluorescent protein markers in advanced optical imaging. *Methods Appl Fluoresc*. 2022;10(4):042002. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ac7d3f>
19. Liu M, Wang B, Wang F, et al. Soluble expression of single-chain variable fragment (scFv) in *Escherichia coli* using superfolder green fluorescent protein as fusion partner. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(15):6071–9. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09925-6>
20. Lu Q, Li X, Zhao J, et al. Nanobody-horseradish peroxidase and -EGFP fusions as reagents to detect porcine parvovirus in the immunoassays. *J Nanobiotechnology*. 2020;18(1):7. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0568-x>
21. Ilgen P, Grotjohann T, Jans DC, et al. RESOLFT nanoscopy of fixed cells using a Z-domain based fusion protein for labelling. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136233>
22. Yu XT, Fu XY, Gao XY, et al. Fc-specific and covalent conjugation of a fluorescent protein to a native antibody through a photoconjugation strategy for fabrication of a novel photostable fluorescent antibody. *Anal Bioanal Chem*. 2021;413(3):945–53. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03051-3>
23. Глушков АН, Костянко МВ, Аносова ТП и др. Модель исследования иммунологических образов химических канцерогенов. *Российский иммунологический журнал*. 2007;1(3–4):246–50. Glushkov AN, Kostyanko MV, Anosova TP, et al. The model for research of immunological images of chemical carcinogens. *Russian Journal of Immunology*. 2007;1(3–4):246–50 (In Russ.). EDN: SWMMFP
24. Костянко МВ, Глушков АН. Способ получения конъюгата гаптен-белок. Патент Российской Федерации № 2141114; 1998. Kostyanko MV, Glushkov AN. Method of conjugate hapten-protein preparing. Patent of the Russian Federation No. 2141114; 1998 (In Russ.). EDN: JPYAJM
25. Shaner N, Campbell R, Steinbach P, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2004;22(12):1567–72. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>
26. Chu J, Oh Y, Sens A, et al. A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging *in vivo*. *Nat Biotechnol*. 2016;34(7):760–7. <https://doi.org/10.1038/nbt.3550>
27. Гинцбург АЛ, Карягина-Жулина АС, Кормилицына МИ и др. Рекombинантная плазмидная ДНК, кодирующая синтез рекombинантного белка TUL4spCBD, штамм *Escherichia coli* M15 [pREP4, pTUL4spCBD] — продуцент рекombинантного белка TUL4spCBD, рекombинантный белок TUL4spCBD и способ его получения, способ получения специфических антител к белку TUL4spCBD. Патент Российской Федерации № 2270249; 2006. Gintsburg AL, Karjagina-Zhulina AS, Kormilitsyna MI, et al. Recombinant plasmid DNA encoding TUL4spCBD recombinant protein synthesis, m15[pREP4, pTUL4spCBD] *Escherichia coli* strain as producer of tul4spcbd recombinant protein, TUL4spCBD recombinant protein, method for production thereof, and method for production of specific antibody against TUL4spCBD protein. Patent of the Russian Federation No. 2270249; 2006 (In Russ.). EDN: VETEJD
28. Nandy S, Crum M, Wasden K, et al. Protein A-Nanoluciferase fusion protein for generalized, sensitive detection of immunoglobulin G. *Anal Biochem*. 2023;660:114929. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114929>
29. Huang QL, Chen C, Chen YZ, et al. Application to immunoassays of the fusion protein between protein ZZ and enhanced green fluorescent protein. *J Immunol Methods*. 2006;309(1–2):130–8. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.11.009>
30. Chu J, Oh Y, Sens A, et al. A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging *in vivo*. *Nat Biotechnol*. 2016;34(7):760–7. <https://doi.org/10.1038/nbt.3550>
31. Bajar BT, Wang ES, Zhang S, et al. A guide to fluorescent protein FRET pairs. *Sensors (Basel)*. 2016;16(9):1488. <https://doi.org/10.3390/s16091488>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.М. Елисейкин, А.Е. Студенников, А.Н. Глушков** — формирование концепции работы; **А.М. Елисейкин** — написание текста рукописи, формулирование выводов; **А.М. Елисейкин, И.В. Маргатский, В.Е. Артемов, А.В. Марущак, И.С. Понкратенко** — дизайн и выполнение экспериментов; **А.Н. Глушков** — формулирование выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Благодарности. Коллектив авторов благодарит В.А. Устинова и И.С. Гребенщикова за ценные консультации при обсуждении результатов проведенного исследования.

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.M. Eliseykin, A.E. Studennikov, A.N. Glushkov** conceptualised the study. **A.M. Eliseykin** drafted the manuscript and formulated the conclusions. **A.M. Eliseykin, I.V. Margatskiy, V.E. Artemov, A.V. Marushchak, I.S. Ponkratenko** developed the design and conducted the experiments. **A.N. Glushkov** formulated the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to V.A. Ustinov and I.S. Grebenshchikov for valuable advice when discussing the study results.

Об авторах / Authors

Елисейкин Алексей Михайлович / Alexey M. Eliseykin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9134-5586>

Маргатский Иван Владимирович / Ivan V. Margatskiy

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-7602-0230>

Артемов Владислав Евгеньевич / Vladislav E. Artemov

Марущак Анна Владимировна / Anna V. Marushchak

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9560-7563>

Понкратенко Игорь Сергеевич / Igor S. Ponkratenko

Глушков Андрей Николаевич, д-р мед. наук / Andrey N. Glushkov, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8560-6719>

Студенников Артем Евгеньевич, канд. биол. наук / Artem E. Studennikov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6623-8818>

Поступила 20.10.2025

После доработки 11.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Online first 20.05.2026

Received October 20, 2025

Revised February 11, 2026

Accepted March 13, 2026

Online first May 20, 2026



Оценка полноты сорбции адсорбированных вакцин для профилактики дифтерии и столбняка

Е.И. Комаровская , К.А. Лыско

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

✉ Комаровская Елена Игоревна; Komarovskaya@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Степень адсорбции компонентов вакцины на адъюванте определяет эффективность вакцины. Требования к показателю степени адсорбции антигенов в готовом продукте не установлены ВОЗ, тогда как в Государственной фармакопее Российской Федерации регламентированы. Разница в требованиях налагает ограничения для равнозначной оценки качества АКДС-вакцин различных производителей, а отсутствие международных требований вызывает сложности в адекватной оценке качества большого разнообразия вакцин.

ЦЕЛЬ. Анализ данных литературы и требований нормативных документов к определению полноты сорбции дифтерийного и столбнячного анатоксинов в составе комбинированных вакцин для совершенствования системы контроля качества и гармонизации национальных требований с мировыми стандартами качества.

ОБСУЖДЕНИЕ. В настоящее время отсутствуют международные требования к качеству геля алюминия гидроксида, используемого для адсорбции, и к величине степени адсорбции компонентов АКДС-вакцины. В ведущих фармакопеех мира установлены стандарты качества для геля алюминия гидроксида, тогда как в Российской Федерации требования не разработаны. Требования к степени адсорбции антигенов производители самостоятельно устанавливают для каждого продукта и определяют эту величину как минимум на стадии получения адсорбированного антигена. В спецификации на готовый препарат этот показатель качества может отсутствовать. Существуют три основных метода оценки степени адсорбции, которые определяют количество несвязанного антигена в супернатанте, при этом чувствительность и стоимость методов отличаются. Содержание антигенов выражают в общепринятых единицах флокуляции — Lf (limit of flocculation). Российские вакцины отличаются от зарубежных методами определения степени адсорбции антигенов и единицами выражения количественного содержания столбнячного анатоксина. Из-за разницы подходов и единиц выражения степени адсорбции отечественные вакцины уступают зарубежным, что, тем не менее, не указывает на низкую эффективность вакцин на основе АКДС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Стандартизация требований к качеству геля алюминия гидроксида для адсорбции, методов контроля степени адсорбции антигенов и единиц выражения количественного содержания антигенов в настоящее время имеет решающее значение для гармонизации фармакопейных требований. Внедрение актуальных требований к адъюванту и современных методов контроля качества степени адсорбции антигенов позволит упростить нормативное регулирование вакцин на основе АКДС.

Ключевые слова: полнота сорбции; степень адсорбции; адъювант; алюминия гидроксид; АКДС-вакцина; методы; *in vivo*; *in vitro*; контроль качества; фармакопейные требования

Для цитирования: Комаровская Е.И., Лыско К.А. Оценка полноты сорбции адсорбированных вакцин для профилактики дифтерии и столбняка. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(2):208–219. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-208-219>

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.

Evaluation of the degree of adsorption of vaccine components in diphtheria and tetanus vaccines adsorbed

Elena I. Komarovskaya , Ksenia A. Lysko 

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

✉ Elena I. Komarovskaya; Komarovskaya@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The degree of adsorption of vaccine components on the adjuvant determines vaccine efficacy. Requirements for the degree of adsorption of antigen in the finished product have not been established by the WHO, whereas they are regulated in the Russian State pharmacopoeia. These differences in requirements limit the comparable quality assessment of DTP vaccines from different manufacturers, and the lack of international standards complicates adequately assessing the quality of a wide variety of vaccines.

AIM. To analyze regulatory requirements and literature data for determining the completeness of adsorption of diphtheria and tetanus toxoids in combined vaccines in order to improve quality control systems and harmonize national requirements with global quality standards.

DISCUSSION. Currently, there are no international requirements for the quality of aluminum hydroxide gel for adsorption or for the degree of adsorption of components of DTP vaccine. Leading global pharmacopoeias establish quality standards for aluminum hydroxide gel used for adsorption; however, no requirements have been developed in the Russian Federation. Manufacturers independently establish requirements for the degree of adsorption of antigen for each product, determining this value at least at the stage of obtaining the adsorbed antigen. This quality indicator may not be included in the specifications for the finished product. There are three main methods for assessing the degree of adsorption. They determine the amount of unbound antigen in the supernatant; their sensitivity and cost vary. Antigen content is expressed in generally accepted flocculation units – Lf (Limit of Flocculation). Domestic vaccines differ from foreign ones in the methods for determining the degree of antigen adsorption and the units used to express the quantitative content of tetanus toxoid. Due to the differences in approaches and units for expressing the degree of adsorption, domestic vaccines are inferior to foreign ones. However, this fact does not indicate the low efficacy of domestic DTP-based vaccines.

CONCLUSIONS. Standardizing aluminum hydroxide gel quality requirements for adsorption, antigen adsorption monitoring methods, and units for expressing quantitative antigen content is crucial for harmonizing pharmacopoeial requirements. Implementing current adjuvant requirements and current antigen adsorption quality control methods will simplify regulatory frameworks for DTP-based vaccines.

Keywords: degree of adsorption; adjuvant; aluminum hydroxide; DPT vaccine; *in vivo* methods; *in vitro* methods; quality control; pharmacopoeial requirements

For citation:

Komarovskaya E.I., Lysko K.A. Evaluation of the degree of adsorption of vaccine components in diphtheria and tetanus vaccines adsorbed. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(2):208–219. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-208-219>

Funding. This study was conducted at 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 state registration No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Адьюванты вакцин стимулируют формирование сильного и продолжительного иммунного ответа, а их использование в вакцинах позволяет уменьшить концентрацию антигенов, повысить эффективность и снизить производственные затраты [1–4]. Соединения на основе алюминия (алюминия гидроксид, алюминия фосфат, алюминиево-калиевые квасцы) используют в вакцинах практически сто лет. Адьювантный эффект соединений на основе алюминия впервые описал в 1926 г. А. Гленни, который получил адсорбированный дифтерийный анатоксин и доказал, что его эффективность выше неадсорбированного анатоксина. Такие адьюванты в настоящее время широко используют в вакцинах против гепатита А и В, дифтерии, столбняка, коклюша, гемофильной инфекции типа b, вируса папилломы человека, менингококковой инфекции (серогруппы В и ABCWY), а также пневмококковой инфекции [5, 6].

Вакцины производят как монопрепараты, но в основном как комбинированные препараты, состоящие из двух и более антигенов. Первая комбинированная адсорбированная вакцина для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша (АКДС-вакцина) широко применяется с середины 40-х годов прошлого столетия. АКДС-вакцина является ключевой в календаре прививок в каждой стране мира. Начиная с 1990-х годов реализация стратегии профилактики и контроля инфекционных заболеваний привела к созданию новых комбинаций вакцин на основе АКДС-вакцины [7]. Новые комбинированные вакцины предусматривают профилактику бактериальных и вирусных инфекций, некоторые из них предназначены для людей без ограничения по возрасту. В настоящее время известно около 15 различных комбинаций вакцин на основе АКДС¹.

Применение комбинированных многокомпонентных вакцин позволяет обеспечить широкий

охват населения вакцинацией, эффективнее соблюдать режим вакцинации, сократить количество инъекций и визитов к врачу и снизить логистические издержки, особенно в странах с ограниченными ресурсами [8, 9]. Несмотря на преимущества многокомпонентных вакцин, существует ряд нерешенных проблем, связанных с антигенной интерференцией, выбором совместимых адьювантов, сложностями производства и различиями в требованиях национальных регуляторных органов. Каждый антиген в составе комбинированной вакцины производится отдельно в соответствии со своими правилами и стандартами контроля качества. Затем антигены объединяют в единый препарат, что делает общий процесс производства достаточно сложным и дорогостоящим. Это ограничивает число производителей, способных осуществить крупномасштабное производство поливалентных вакцин [5].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) и регуляторные органы некоторых стран разработали ряд нормативных документов, включая руководства и рекомендации по производству и контролю качества комбинированных вакцин². Документы ВОЗ составляют основу для услуги преквалификации ВОЗ и закупки вакцин для глобальных программ иммунизации Организацией Объединенных Наций. Эти документы также могут быть приняты национальными регуляторными органами и производителями в качестве основных требований к производству и контролю качества препаратов.

При производстве вакцин соблюдаются строгие требования контроля качества для каждого этапа производственного цикла, обеспечивающие безопасность и эффективность от партии к партии. Одним из важных показателей качества является степень адсорбции антигенов на адьюванте (в Российской Федерации используется термин «полнота сорбции»)³.

¹ Diphtheria, tetanus, pertussis containing vaccines: Market and supply. UNICEF; 2023. <https://www.unicef.org/supply/media/17606/file/Diphtheria-Tetanus-Pertussis-Vaccine-Containing-Market-and-Supply-Update-June-2023.pdf>
Gavi vaccine funding guidelines. <https://www.gavi.org/sites/default/files/support/guidelines-2026/gavi-60-funding-guidelines-annexes.pdf>

² Technical report series, No. 800. WHO; 1990.
Technical report series, No. 980. WHO; 2012.

Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

³ ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

Постоянный уровень степени адсорбции компонентов вакцины от серии к серии также указывает на стабильность процесса производства вакцины. Требования к показателю степени адсорбции компонентов АКДС-вакцины менялись на протяжении всего периода существования препарата. В Руководстве ВОЗ по производству и качеству вакцины против столбняка (1977 г.) упоминается, что должно быть адсорбировано не менее 80% анатоксина⁴. Согласно существующим требованиям ВОЗ и Европейской фармакопеи (Ph. Eur.) степень адсорбции компонентов вакцины должна соответствовать степени адсорбции серий, безопасность и эффективность которых была подтверждена в клинических испытаниях⁵. В рекомендациях ВОЗ для АКДС-вакцины нет прямого указания на величину степени адсорбции дифтерийного (ДА) и столбнячного (СА) анатоксинов, а есть только указания на то, что требования должны быть утверждены национальным контрольным органом. В США минимальные требования к СА и ДА для взрослых составляют не менее 75% адсорбции дифтерийного компонента. Отсутствие международных требований к полноте сорбции вызывает сложности в адекватной оценке качества большого разнообразия АКДС-вакцин, присутствующих на современном фармацевтическом рынке.

Цель работы — анализ данных литературы и требований нормативных документов к определению полноты сорбции дифтерийного и столбнячного анатоксинов в составе комбинированных вакцин для совершенствования системы контроля качества и гармонизации национальных требований с мировыми стандартами качества.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Значение адсорбции антигена на адъюванте и механизм действия

Несмотря на то что адъюванты на основе алюминия используются в широкой медицинской практике с 1940-х годов, точный механизм действия остается до сих пор неясным. Адъювантное действие **гидроксида алюминия** проявляется в эффекте депо, стимуляции фагоцитоза антиген-презентирующими клетками, дестабилизации мембраны дендритных клеток, активации системы комплемента, стимуляции и дифференцировке CD4⁺ Т-клеток [5, 10, 11]. В экспериментах было показано, что адсорбированный ДА может сохраняться в месте инъекции

более 7 нед. [5]. Исследования последних десятилетий продемонстрировали, что адъюванты избирательно стимулируют дендритные клетки, индуцируя выработку цитокинов и стимулируя высвобождение антигена. Таким образом, адъюванты оказывают прямое или косвенное воздействие на клетки, участвующие в формировании иммунного ответа.

Иммуностимулирующий ответ выражается в развитии воспалительной реакции в месте инъекции адсорбированной вакцины. Воспалительная реакция на введение вакцины играет ведущую роль в формировании иммунного ответа [1, 12, 13]. В экспериментах на мышах было показано, что через несколько часов в месте инъекции появлялись нейтрофилы и макрофаги. Макрофаги поглощают частицы адъюванта, что стимулирует активную миграцию эозинофилов, макрофагов и антигенпрезентирующих клеток [14]. G.L. Morefield с соавт. [10] и M.W. Munks с соавт. [15] продемонстрировали, что введение вакцины индуцирует миграцию нейтрофилов, которые выделяют цитокины: интерлейкин-1 бета, интерлейкин-5 и хемокиновый лиганд 2. В свою очередь, это ведет к активации Т-клеток, моноцитов и тучных клеток, привлекая к очагу воспаления нейтрофилы и эозинофилы. Адъюванты усиливают ответы как Т-, так и В-лимфоцитов, что приводит к увеличению пула В-клеток памяти и долгоживущих плазматических клеток, секретирующих антитела.

Адъювант может усиливать способность моноцитов и дендритных клеток к захвату антигена в макрофагах и периферической крови. Комплексы, содержащие адъюванты на основе алюминия, способствуют активации и созреванию антигенпрезентирующих клеток [1, 10, 16, 17]. Результаты исследований [1, 10, 18] показали, что адъюванты активируют дифференцировку моноцитов в дендритные клетки, тем самым увеличивая способность к захвату антигена. Зрелые антигенпрезентирующие макрофаги особенно важны для формирования иммунного ответа, который обеспечивает долгосрочную защиту. Адъювант также способствует переносу антигенпрезентирующих клеток в лимфоидную ткань. После подкожной или внутримышечной инъекции такие клетки продолжают мигрировать в удаленные лимфатические узлы и селезенку [19]. Кроме того, дендритные клетки попадают в кровь через грудной проток лимфатической

⁴ Manual for the production and control of vaccines: tetanus toxoid. WHO; 1977. <https://iris.who.int/handle/10665/70166>

⁵ Technical report series, No. 980. WHO; 2012.

Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

системы и мигрируют в различные органы. Адъювант на основе алюминия также может индуцировать выработку интерлейкина-1 бета и интерлейкина-18 [1, 10, 17], способствуя дифференцировке CD4⁺ Т-клеток в Th2-клетки и усиливая выработку антител.

Таким образом, иммунный ответ, вызываемый адсорбированными вакцинами, формируется посредством комплекса механизмов. Результаты современных исследований механизмов действия вакцин, адсорбированных на адъювантах на основе алюминия, еще раз доказывают, что степень адсорбции антигенов является одним из важных показателей качества вакцины, которому должна соответствовать вакцина в течение всего срока годности.

Технологии адсорбции антигенов в вакцинах

Антигены, входящие в состав многокомпонентных комбинированных вакцин, отличаются по своей природе. Вследствие чего производство комбинированных адсорбированных вакцин является сложным процессом. Известно, что компоненты вакцины могут оказывать взаимное влияние друг на друга из-за физических, химических и иммунологических взаимодействий. Проблема заключается и в том, что число возможных взаимодействий между различными компонентами в комбинированных вакцинах не увеличивается линейно по мере добавления антигенов. Эффект взаимного влияния компонентов вакцины непредсказуем и должен быть изучен для каждого продукта [11, 20, 21]. Тщательное изучение взаимодействия антигена и адъюванта имеет основополагающее значение для предотвращения непредвиденных результатов взаимодействия и для обеспечения стабильности вакцины после процесса сорбции. Выбор технологии адсорбции может отчасти способствовать решению проблемы.

Существуют следующие технологии адсорбции антигенов в комбинированных вакцинах: последовательная адсорбция, конкурентная адсорбция, раздельная адсорбция.

Последовательная адсорбция заключается в том, что адъювант помещают в реактор, куда последовательно добавляют антигены. В данной технологии степень адсорбции зависит от адъюванта, последовательности вносимых антигенов, условий сорбции — pH и изоэлектрической точки антигена. Эта технология достаточно проста, но имеет риски, связанные с тем, что в зависимости от очередности внесения компонентов может происходить частичная десорбция уже сорбированных [22, 23].

Конкурентная адсорбция — сорбция *in situ*, когда в реактор вносят сразу все компоненты вакцинной смеси. В этом случае антигены конкурируют за место на поверхности адъюванта. Такая технология сорбции была разработана одной из первых в истории вакцинного дела, когда была установлена способность солей алюминия усиливать иммунный ответ [24]. Однако в подобном процессе существуют серьезные риски, так как на этапе установления термодинамического равновесия ранее адсорбированные антигены могут снова десорбироваться. Кроме того, одни антигены могут маскировать другие посредством образования «белковой короны», которая из-за высокой плотности адсорбированных антигенов может блокировать или уменьшать доступ клеток иммунной системы к целевому антигену. В исследованиях степени адсорбции некоторых вакцин [24] в надосадочной жидкости доля неадсорбированных антигенов составила более 50% и количество неадсорбированного антигена в супернатанте менялось в процессе хранения.

Раздельная адсорбция — адсорбция антигенов в индивидуально оптимизированных и контролируемых условиях. Раздельная адсорбция каждого антигена является лучшим способом достижения стабильной и полной адсорбции. Применение полностью сорбированных антигенов для сведения всех компонентов вакцины в готовую форму, а именно их разбавление, смешивание и корректировка значения pH, не приведут к десорбции антигенов в течение срока годности вакцины [24].

Таким образом, производство адсорбированных вакцин является сложным процессом, но при соблюдении определенных условий возможно производство вакцин с полной адсорбцией антигенов в течение всего срока годности. Для каждой новой комбинированной вакцины необходима индивидуальная разработка условий адсорбции, даже если вакцина содержит хорошо известные компоненты.

Анализ нормативных требований к качеству адъюванта

Безопасность, эффективность и стабильность вакцины являются основными требованиями для обеспечения ожидаемой иммунологической защиты в течение всего срока годности вакцинного препарата. Учитывая, что в комбинированных вакцинах все еще существуют неизученные взаимодействия между компонентами вакцины, минимальным требованием является производство безопасного и стабильного препарата. При производстве препарата процесс

адсорбции антигенов зависит не только от характеристик антигенов. Значительное влияние оказывают размер и тип используемого соединения алюминия, заряды адъювантов и антигенов. Физико-химические свойства частиц, такие как размер, заряд, гидрофобность, морфология, шероховатость поверхности, кривизна, гибкость, влияют на характер и степень адсорбции белкового антигена [11, 21, 25].

На процесс адсорбции влияют некоторые технические параметры производственных условий, таких как порядок добавления реагентов, скорость смешивания, геометрия лопастей [20], и качественные характеристики самого адсорбента. Для АКДС-вакцины в качестве адъюванта часто используют гель алюминия гидроксида (АлГ). Одни производители вакцин производят гель АлГ самостоятельно, другие используют коммерчески доступные продукты, например Alhydrogel (Дания), или сочетают производство геля АлГ и адсорбцию антигенов в процессах *in situ*. Единые требования к качеству геля АлГ для адсорбции антигена не установлены ВОЗ. Тем не менее в документе ВОЗ № 987⁶ уделено внимание ключевым качественным характеристикам адъюванта, которые должны быть установлены: размер частиц и адсорбционная способность — важные показатели качества адъюванта для формирования иммунного ответа, стабильность pH и отсутствие посторонних примесей (например, сульфатов, хлоридов и др.), апиrogenность и изоэлектрическая точка. Некоторые из них должны контролироваться для каждой партии адъюванта, в том числе по ряду биохимических и биологических характеристик. В других исследованиях показано, что размер частиц адъюванта оказывает значительное влияние на формирование специфических антител, а именно, чем меньше размер частиц, тем сильнее иммунный ответ [5, 10, 11, 23, 26, 27].

В связи с отсутствием международных нормативных требований к гелю АлГ каждый производитель может разработать частные нормы и критерии оценки, вследствие чего сравнить физико-химические и биологические свойства АлГ различных производителей не представляется возможным. Кроме того, какие-либо упоминания о прямых сравнениях коммерчески

доступных АлГ в рецензируемой научной литературе авторами не обнаружены. В свою очередь, в Ph. Eur. и Фармакопее США установлены требования к гелю АлГ, используемому для адсорбции. С требованиями Ph. Eur. гармонизированы требования к адъювантам на основе соединений алюминия в Китайской фармакопее. В Индийской фармакопее⁷ (монография, посвященная адъювантам) описываются основные физико-химические свойства, которые должны быть изучены и определены, при этом нормативы не установлены. В Российской Федерации в настоящее время отсутствуют фармакопейные требования к качеству геля АлГ, используемого в качестве адъюванта. Опубликован проект общей фармакопейной статьи⁸, который полностью гармонизирован с Ph. Eur. Сравнение нормативных требований к гелю АлГ Европейской и Китайской фармакопей, фармакопее США представлено в *таблице 1*.

В фармакопеях определены требования не только к физико-химическим и биологическим качественным характеристикам (*табл. 1*), но и в отношении содержания примесей. Тесты на сорбционную активность и седиментацию являются критически важными. Сорбционная активность — показатель, по которому определяют максимальное количество антигена, которое может прочно связаться с единицей массы адъюванта. Тест с бычьим сывороточным альбумином (BSA) является «золотым стандартом» для оценки сорбционной способности геля АлГ⁹. BSA — модельный белок, для которого хорошо изучен и детально описан механизм электростатического взаимодействия с гелем АлГ [28]. Определение скорости седиментации не является сложным в выполнении тестом: в градуированный цилиндр наливают гель АлГ и оставляют на ровной поверхности, а через 24 ч визуально определяют объем надосадочной жидкости. Скорость седиментации — важный индикатор качества структуры геля, который показывает, насколько частицы склонны к агрегации, а также является косвенным показателем размера частиц и стабильности суспензии.

В России не разработаны фармакопейные требования к гелю АлГ. Производители адсорбированных вакцин закупают коммерчески доступный гель АлГ или производят *in-house*.

⁶ Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. Technical Report Series No. 987, Annex 2. WHO; 2014.

⁷ 2.7.16 Adjuvants for vaccines. Indian Pharmacopoeia. IX ed; 2022.

⁸ Алюминия гидроксид гидратированный для адсорбции. Проект ОФС. <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia-projects/izdanie-15/alyuminiya-gidroksid-gidratirovanny-dlya-adsorbtsii/?vers=6513>

⁹ Guidelines on the quality, safety and efficacy of vaccines prepared by recombinant DNA technology. Technical Report Series No. 927, Annex 1. WHO; 2005.

USP <1149> "Vaccine Adjuvants". United States Pharmacopeia. USP-NF/PF. Rockville; 2024.

Таблица 1. Сравнение нормативных требований к качеству геля алюминия гидроксида для адсорбции, представленных в Европейской фармакопее, Китайской фармакопее и фармакопее США**Table 1.** Comparison of the regulatory requirements for the quality of aluminum hydroxide gel for adsorption as specified in the European Pharmacopoeia, the Chinese Pharmacopoeia, and the United States Pharmacopoeia

№ п/п No.	Наименование показателя качества Specification	Европейская фармакопея (11 изд.) Ph. Eur. (11th ed.)	Китайская фармакопея, 2020 г. ChP (2020)	Фармакопея США USP
1	Описание Appearance	Белый или почти белый полу-прозрачный вязкий коллоидный гель; при отстаивании может образоваться надосадочная жидкость White or almost white, translucent, viscous, colloidal gel; a supernatant may be formed upon standing	Светло-голубая или молочно-белая коллоидная суспензия, не содержащая посторонних примесей или комков, не рассеивающаяся при встряхивании A light blue or milky white colloidal suspension, free from foreign impurities or lumps, which does not disperse when shaken	–
2	Подлинность Identification	Качественная реакция с раствором соляной кислоты Qualitative reaction with hydrochloric acid solution		
3	Содержание алюминия Aluminum content	90–110%	Должно соответствовать утвержденной спецификации It must comply with the approved specification	90–110%
4	pH	5,5–8,5	Должен отвечать утвержденным техническим условиям It must meet the approved technical specifications	5,5–8,0
5	Размер частиц Particle size	–	1–10 мкм 1–10 μm	1–10 мкм 1–10 μm
6	Скорость седиментации Sedimentation rate	Объем надосадочной жидкости после отстаивания в течение 24 ч должен составлять не более 20% от общего объема The volume of supernatant liquid after settling for 24 hours should be no more than 20% of the total volume		–
7	Сорбционная активность Adsorption capacity	Тест с бычьим сывороточным альбумином Bovine serum albumin test		
8	Сульфаты Sulfates	≤0,5%	≤0,5%	≤0,6%
9	Нитраты Nitrates	≤100 мкг/мл ≤100 μg/mL	≤100 мкг/мл ≤100 μg/mL	–
10	Аммоний Ammonium	≤50 мкг/г ≤50 μg/g	≤50 мкг/г ≤50 μg/g	–
11	Хлориды Chlorides	≤0,33%	≤0,33%	≤0,47%
12	Мышьяк Arsenic	Исключен из Ph. Eur. 11 изд. (в Ph. Eur. 7 изд. — ≤1 мкг/г) Excluded from Ph. Eur. 11th ed. (in Ph. Eur. 7th ed.: ≤1 μg/g)	≤0,0001%	≤0,0008%
13	Железо Iron	≤15 мкг/0,67 г ≤15 μg/0.67 g	≤15 мг/л ≤15 mg/L	–
14	Тяжелые металлы (как Pb) Heavy metals (as Pb)	Исключен из Ph. Eur. 11 изд. (в Ph. Eur. 7 изд. — ≤20 мкг/мл) Excluded from Ph. Eur. 11th ed. (in Ph. Eur. 7th ed.: ≤20 μg/mL)	≤0,002%	≤0,0083%
15	Стерильность Sterility	–	Должен быть стерильным It must be sterile	
16	Бактериальные эндотоксины Bacterial endotoxins	Менее 5 ЕЭ эндотоксина на 1 мг алюминия Less than 5 EU of endotoxin per milligram of aluminum		

Таблица подготовлена авторами по данным Европейской фармакопеи, Китайской фармакопеи и фармакопеи США / The table was prepared by the authors based on data from the European Pharmacopoeia, the Chinese Pharmacopoeia, and the United States Pharmacopoeia

Примечание. «–» — показатель отсутствует.

Note. –, no requirements established.

В основном представлены коммерчески доступные гели алюминия гидроокиси, например Alhydrogel (Дания) фармакопейного качества и продукт производства ФКП «Щелковский биокомбинат»¹⁰, на официальном сайте которого указаны способ получения и описание продукта.

В открытом доступе авторы данной статьи не обнаружили информации о спецификациях на гели АлГ, производимые *in-house*. В работах, посвященных получению АлГ и изучению его свойств [29–32], сорбционную активность геля АлГ оценивали по способности сорбировать краситель конго красный методом колориметрии. Очевидно, что методы, применяемые для оценки качественных характеристик геля АлГ, должны быть адекватными для обеспечения безопасности и стабильности конечного продукта¹¹, следовательно, должны быть валидированы и стандартизированы. Поскольку в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) требования к гелю АлГ, используемому в качестве адъюванта, не сформулированы, следует полагать, что российские производители вакцин для контроля качества геля АлГ применяют требования и методы *in-house*.

Гель АлГ для адсорбции антигенов является одним из ключевых компонентов вакцины, который напрямую взаимодействует с иммунной системой, и его чистота, стабильность и стандартизованность по качественным характеристикам определяют главные свойства вакцины — безопасность и эффективность на протяжении всего срока годности. В то же время нормативные требования в Российской Федерации к АлГ как к адъюванту основаны только на общей фармакопейной статье¹², что является недостаточным для формирования практических регуляторных подходов по надзору за качеством адъювантов в вакцинах на основе АКДС.

Методы контроля степени адсорбции

В настоящее время отсутствуют международные требования к величине степени адсорбции компонентов АКДС-вакцины. Тем не менее производители АКДС-вакцин устанавливают требования и определяют эту величину как минимум на стадии получения адсорбированного антигена и/или на стадии сведения компонентов.

Существуют три метода¹³, пригодных для определения содержания адсорбированных ДА и СА: иммуноферментный анализ (ИФА); ракетный иммуноэлектрофорез (РИФ); реакция флоккуляции по Рамону.

Метод РИФ основан на электрофоретическом движении антигена в геле, содержащем специфические антитела. При действии электрического тока антиген мигрирует, образуя преципитат с антителами, формируя пики в виде «ракет». Высота «ракеты» прямо пропорциональна концентрации антигена.

Методы ИФА и РИФ предусматривают испытание целого образца вакцины (вакцину десорбируют для удаления адъюванта) и надосадочной жидкости, которую получают путем центрифугирования. Для постановки методов требуется специальное оборудование и соответствующие критичные реагенты, такие как моноклональные и/или поликлональные антитела, а также стандартные сыворотки. Величину степени адсорбции рассчитывают как отношение содержания анатоксина в надосадочной жидкости (супернатант) к содержанию анатоксина в целом образце вакцины и выражают в процентах (формула (1))¹⁴:

$$\text{Степень адсорбции (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100, \quad (1)$$

где А — количество анатоксина в целом образце вакцины, Лф/мл; В — количество анатоксина в супернатанте, Лф/мл.

Содержание неадсорбированных анатоксинов в реакции флоккуляции определяют в надосадочной жидкости. При взаимодействии антигена с антителом, взятых в эквивалентном количестве, происходит образование видимых хлопьев — флоккулятов. Метод является полуколичественным; результат выражают как содержание неадсорбированного анатоксина в надосадочной жидкости, значение которого не должно превышать регламентированного содержания. Степень адсорбции выражают в общепринятых международных единицах флоккуляции Lf (limit of flocculation, flocculation value, флоккулирующая единица). Согласно Рекомендациям ВОЗ¹⁵ по производству и контролю качества АКДС-вакцины методом РИФ и в реакции флоккуляции по Рамону, определяют активность, чистоту

¹⁰ Гель гидроокиси алюминия. <https://biocombinat.ru/catalog/8/93/>

¹¹ Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on adjuvants in vaccines for human use. London: EMA; 2005. Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. Technical Report Series No. 987, Annex 2. WHO; 2014.

¹² ОФС.1.1.0006 Субстанции для фармацевтического применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2025.

¹³ Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

¹⁴ Там же.

¹⁵ Там же.

и содержание антигена. Для оценки степени адсорбции ДА и СА рекомендован метод ИФА.

В Ph. Eur. требование к контролю степени адсорбции анатоксинов в готовой форме вакцины отсутствует, количественное содержание неадсорбированных анатоксинов в надосадочной жидкости не лимитируется. В Российской Федерации подход к оценке данного показателя качества иной — установлены строгие требования к полноте сорбции антигенов в готовом препарате¹⁶. В отношении ДА этот показатель должен составлять не более 1 Лф/мл в надосадочной жидкости; показатель определяют в реакции флоккуляции по Рамону; СА — не более 1 ЕС/мл в надосадочной жидкости (ЕС — единица связывания). ЕС представляет собой такое количество анатоксина, которое способно связать 1 МЕ (международная единица) соответствующей антитоксической сыворотки; показатель определяют в тесте *in vivo* на белых мышах¹⁷. Если исследование удовлетворяет этим условиям, считают, что сорбция антигена полная.

Сравнение существующих методов определения степени адсорбции ДА и СА в АКДС-вакцине представлено в таблице 2. Метод определения степени адсорбции СА на мышах не отражен, поскольку применяется только в Российской

Федерации и результат выражается не в общепринятых международных единицах.

ИФА является наиболее высокочувствительным из трех рассматриваемых методов и характеризуется пределом количественного определения¹⁸: ДА — 0,005 Лф/мл, СА — 0,002 Лф/мл. Для контроля степени адсорбции возможно применение как прямого, так и непрямого теста ИФА. Критичными реагентами (два или три наименования) являются международные стандарты NIBSC (The National Institute for Biological Standards and Control), которые можно заменить на стандарты *in-house* при условии их калибровки относительно международных стандартов. Метод РИФ считают менее точным и чувствительным по сравнению с ИФА. Постановка реакции флоккуляции не связана с использованием специального оборудования, но для работы необходимы стандартные сыворотки, откалиброванные относительно международных стандартов. Реакция флоккуляции непригодна для количественного определения антигенов, сорбированных на АлГ. Таким образом, несмотря на высокую стоимость постановки метода ИФА, только данный метод позволяет с наибольшей точностью определить количество адсорбированных антигенов.

Таблица 2. Сравнение методов контроля степени адсорбции дифтерийного и столбнячного анатоксинов

Table 2. Comparison of methods for controlling the degree of adsorption of diphtheria and tetanus toxoids

Реакция флоккуляции по Рамону <i>Ramon flocculation test</i>	Иммуноферментный анализ <i>ELISA</i>	Ракетный иммуноэлектрофорез <i>Rocket immunoelectrophoresis</i>
Достоинства / <i>Advantages</i>		
Простота исполнения; учет реакции проводят визуально «невооруженным глазом» — фиксируют появление флоккулятов; низкая стоимость. Результат — в течение 1 сут, длительность испытания — от 1,5 до 2 ч <i>Simplicity of execution; the reaction is monitored visually "with the naked eye" by detecting the formation of flocculates; low cost. Results within 24 h; test duration 1.5–2 h</i>	Количественный метод. Высокочувствительный метод <i>Quantitative method. Highly sensitive method</i>	Количественный метод. Чувствительный метод <i>Quantitative method. Sensitive method</i>
Ограничения / <i>Restrictions</i>		
Метод полуколичественный; результаты могут значительно варьировать в зависимости от опыта «насмотренности» исследователя <i>Semi-quantitative method; results may vary significantly depending on the researcher's experience</i>	Относительно высокая стоимость; необходимость использования критических реагентов — международные стандартные образцы и препараты антител; требуется наличие специального оборудования; длительность испытания не менее 2 сут <i>Relatively high cost; need for critical reagents (international standards and antibodies); requires specialized equipment; test duration at least 2 days</i>	

Таблица составлена авторами на основе данных WHO^a / The table was prepared by the authors using the WHO data^a

^a Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

¹⁶ ФС.3.3.1.0010.15 Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная (АКДС-вакцина). Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

¹⁷ ОФС.1.7.2.0032.15 Определение содержания анатоксинов в реакции антитоксинсвязывания. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

¹⁸ Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO; 2013.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка качества адъюванта и степени адсорбции антигенов на нем имеет решающее значение для безопасности и эффективности вакцины. Необходимость адсорбции компонентов АКДС-вакцин на адъювантах и важность ее количественной оценки являются предметом рассмотрения с точки зрения эффективности конечного вакцинного продукта [22, 26, 33, 34]. Данные некоторых исследований свидетельствуют о том, что количество антигена, адсорбированного на адъюванте, не коррелирует с титром антител, полученных в результате вакцинации, из чего следует вывод, что подход к оценке качества вакцины по данному показателю может быть пересмотрен. Вне зависимости от современных исследований производители АКДС-вакцин не планируют отказываться от определения степени адсорбции антигенов на определенных стадиях производственного цикла. Этот показатель остается важным маркером стабильности производства и качества вакцины не только для производителей, но и для регуляторных органов.

Сравнительная оценка современных требований к показателю степени адсорбции ДА и СА в АКДС-вакцине выявила, что в Российской Федерации не выработаны нормативные требования к качеству геля алюминия как адъюванту. Применяемые в производстве адсорбированных препаратов коммерчески доступные препараты АлГ имеют существенные различия в качественных характеристиках. Кроме того, производитель вакцины должен самостоятельно определять их перечень, нормы, профиль безопасности и оценивать соответствие качеству. Ввиду критического влияния качества АлГ на безопасность и иммуногенность вакцины качественные характеристики и методы их контроля должны быть установлены в ГФ РФ, что позволит более системно понимать процесс адсорбции и надежно гарантировать стабильность производственного процесса.

В вакцинах российского производства содержание столбнячного компонента и степень его адсорбции оценивают методом *in vivo* на белых мышах, выражают в единицах связывания (ЕС), а не в Lf, как установлено ВОЗ. Разница подходов к оценке качества и единиц выражения степени адсорбции ограничивает конкурентоспособность отечественных вакцин по сравнению с зарубежными. Следует отметить, что эффективность российских вакцин против дифтерии и столбняка отвечает международным

требованиям, о чем также свидетельствует низкая заболеваемость дифтерией и столбняком среди всех групп населения¹⁹. Для гармонизации требований к содержанию СА необходимо провести сравнительные испытания активности образцов столбнячных анатоксинов в реакции флоккуляции и в реакции связывания антитоксина для оценки возможности перехода от ЕС к Lf. Результаты данной работы будут иметь научно-практическую значимость для гармонизации требований к выражению содержания СА, исключения необходимости работы с патогенным материалом при заражении животных, а также замены метода *in vivo* на *in vitro* в русле следования принципам 3Rs.

Степень адсорбции антигенов в реакции флоккуляции по Рамону определяют не только в Российской Федерации, но и, например, в Таиланде [23]. С целью соответствия производства и контроля АКДС-вакцины рекомендациям ВОЗ Государственная фармацевтическая организация Таиланда провела сравнительные испытания реакции флоккуляции и ИФА. Полученные результаты позволили сделать вывод, что ИФА является наиболее подходящим методом для оценки степени адсорбции анатоксинов. В ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России были проведены предварительные испытания степени сорбции ДА и СА в отечественных вакцинах методом ИФА, которые показали, что степень адсорбции для каждого из анатоксинов составила более 90%. В настоящее время существуют объективные предпосылки и возможности для замены применяемых в Российской Федерации методик определения степени адсорбции ДА и СА на количественную и более робастную методику ИФА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ требований нормативных документов и данных литературы указывает на необходимость изменения используемых в Российской Федерации подходов к контролю степени адсорбции антигенов в комбинированных АКДС-вакцинах. Целесообразно формирование отдельных нормативных требований к гелю алюминия гидроксида, в том числе требований к ключевым показателям (размер частиц, сорбционная активность, наличие посторонних примесей).

Очевидна потребность усовершенствования существующих методик определения степени адсорбции дифтерийного и столбнячного

¹⁹ Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, <https://www.rosпотребнадзор.ru>

анатоксинов. Стандартизация требований к качеству геля алюминия гидроксида для адсорбции и переход на более точные методы исследований позволят уменьшить различия в нор-

мативных требованиях к комбинированным АКДС-вакцинам, принимая во внимание современные подходы к регистрации и взаимному признанию вакцин.

Литература/References

- Raponi A, Brewer JM, Garside P, Laera D. Nanoalum adjuvanted vaccines: Small details make a big difference. *Semin Immunol.* 2021;56:101544. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101544>
- Amini Y, Moradi B, Fasihi-Ramandi M. Aluminum hydroxide nanoparticles show strong activity to stimulate Th-1 immune response against tuberculosis. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2017;45:1331–5. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1233111>
- Oyewumi MO, Kumar A, Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: Correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev Vaccines.* 2010;9(9):1095–107. <https://doi.org/10.1586/erv.10.89>
- O'Hagan DT, Fox CB. Are we entering a new age for human vaccine adjuvants? *Expert Review of Vaccines.* 2015;14(7):909–11. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1043273>
- Lan J, Feng D, He X, et al. Basic properties and development status of aluminum adjuvants used for vaccines. *Vaccines.* 2024;12:1187. <https://doi.org/10.3390/vaccines12101187>
- Facciola A, Visalli G, Laganà A, Di Pietro A. An overview of vaccine adjuvants: Current evidence and future perspectives. *Vaccines (Basel).* 2022;10(5):819. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050819>
- He X, Pu Y, Li Z, et al. The global regulatory landscape for combined vaccines: A comparative case study of registration strategies for diphtheria-tetanus-pertussis-containing vaccines. *Vaccine.* 2025;54:127017. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2025.127017>
- Fatima M, Hong KJ. Innovations, challenges, and future prospects for combination vaccines against human infections. *Vaccines (Basel).* 2025;13(4):335. <https://doi.org/10.3390/vaccines13040335>
- Marshall GS, Petigara T, Liu Z, et al. Timing of monovalent vaccine administration in infants receiving DTaP-based combination vaccines in the United States. *Pediatr Infect Dis J.* 2022;41(9):775–81. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003609>
- Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, et al. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells *in vitro*. *Vaccine.* 2005;23(13):1588–95. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.050>
- He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(2):477–88. <https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>
- Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine.* 2009;27(25–26):3331–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.084>
- Lu F, Hogenesch H. Kinetics of the inflammatory response following intramuscular injection of aluminum adjuvant. *Vaccine.* 2013;31(37):3979–86. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.107>
- McKee AS, Munks MW, MacLeod MK, et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol.* 2009;183(7):4403–14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900164>
- Munks MW, McKee AS, MacLeod MK, et al. Aluminum adjuvants elicit fibrin-dependent extracellular traps *in vivo*. *Blood.* 2010;116(24):5191–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275529>
- Laera D, Hogenesch H, O'Hagan DT. Aluminum adjuvants-back to the future. *Pharmaceutics.* 2023;15(7):1884. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071884>
- Алпатова НА, Авдеева ЖИ, Лысикова СЛ и др. Общая характеристика адъювантов и механизм их действия (часть 1). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(4):245–56. Alpatova NA, Avdeeva ZH, Lysikova SL, et al. General characteristics of adjuvants and their mechanism of action (part 1). *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020;20(4):245–56 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-245-256>
- Ho NI, Huis in 't Veld LGM, Raaijmakers TK, Adema GJ. Adjuvants enhancing cross-presentation by dendritic cells: The key to more effective vaccines? *Front Immunol.* 2018;9:2874. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02874>
- Aradottir Pind AA, Dubik M, Thorsdottir S, et al. Adjuvants enhance the induction of germinal center and antibody secreting cells in spleen and their persistence in bone marrow of neonatal mice. *Front Immunol.* 2019;10:2214. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02214>
- Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4:114. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00114>
- Cerofolini L, Giuntini S, Ravera E, et al. Structural characterization of a protein adsorbed on aluminum hydroxide adjuvant in vaccine formulation. *NPJ Vaccines.* 2019;4:20. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0115-7>
- Clapp T, Siebert P, Chen D, Jones Braun L. Vaccines with aluminum-containing adjuvants: Optimizing vaccine efficacy and thermal stability. *J Pharm Sci.* 2011;100(2):388–401. <https://doi.org/10.1002/jps.22284>
- Laera D, Scarpellini C, Tavarini S, et al. Maturation of aluminum adsorbed antigens contributes to the creation of homogeneous vaccine formulations. *Vaccines (Basel).* 2023;11(1):155. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010155>
- Matheis W, Zott A, Schwanig M. The role of the adsorption process for production and control combined adsorbed vaccines. *Vaccine.* 2001;20(1–2):67–73. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00317-6](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00317-6)
- Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines – current status, problems and future prospects. *Vaccine.* 1995;13(14):1263–76. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(95\)00011-0](https://doi.org/10.1016/0264-410x(95)00011-0)
- Hogenesch H, O'Hagan DT, Fox CB. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: You might just get what you want. *NPJ Vaccines.* 2018;3:51. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0089-x>
- Mbhele Z, Thwala L, Khoza T, Ramagoma F. Evaluation of aluminium hydroxide nanoparticles as an efficient adjuvant to potentiate the immune response against *Clostridium botulinum* serotypes C and D toxoid vaccines. *Vaccines (Basel).* 2023;11(9):1473. <https://doi.org/10.3390/vaccines11091473>
- Hem SL, White JL. Structure and properties of aluminum-containing adjuvants. *Pharm Biotechnol.* 1995;6:249–76. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1823-5_9
- Степанова ЕВ, Шарыгин ДЕ, Швалев ЮБ. Влияние условий осаждения на физико-химические характеристики геля

- гидроксида алюминия. *Известия Томского политехнического университета*. 2004;307(1):99–101. Stepanova EV, Sharygin DE, Shvaley YuB. Effect of precipitation conditions on the physicochemical characteristics of aluminum hydroxide gel. *News of Tomsk Polytechnic University*. 2004;307(1):99–101 (In Russ.). EDN: [HTLMKE](#)
30. Стась НФ. Зависимость свойств гидроксида алюминия от способа его получения, *Современные проблемы науки и образования*. 2012;(3):121. Stas NF. Dependence of aluminum hydroxide properties from the method of its synthesis. *Modern Problems of Science and Education*. 2012;(3):121 (In Russ.). EDN: [PAAEKF](#)
31. Кадничанский ЭГ, Бадаев СВ, Храмов ВГ. Адсорбент и способ его получения. Патент Российской Федерации № 2293744 С1; 2005. Kadnichanskij EG, Badaev SV, Hramov VG. Adsorbent and a method for preparation thereof. Patent of the Russian Federation No. 2293744 С1; 2005 (In Russ.). EDN: [FCCITT](#)
32. Быстрицкий ЛД, Долженко НН, Ставицкая НХ и др. Способ получения геля алюминия гидроксида для производства медицинских иммунобиологических препаратов. Патент Российской Федерации № 2171678 С1; 2000. Bystrickij LD, Dolzhenko NN, Stavitskaja NK, et al. Method of preparing aluminium hydroxide gel for production of medicinal immunobiological preparations. Patent of the Russian Federation No. RU2171678 С1; 2000 (In Russ.). EDN: [GCTIED](#)
33. Chang M, Shi Y, Nail SL, et al. Degree of antigen adsorption in the vaccine or interstitial fluid and its effect on the antibody response in rabbits. *Vaccine*. 2001;19(20–22):2884–9. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00559-4](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00559-4)
34. Hansen B, Belfast M, Soung G, et al. Effect of the strength of adsorption of hepatitis B surface antigen to aluminum hydroxide adjuvant on the immune response. *Vaccine*. 2009;27(6):888–92. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.078>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.И. Комаровская** — концепция работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; **К.А. Лыско** — идея исследования, формулировка выводов.

Благодарности. Коллектив авторов благодарит О.В. Проскурину (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) за выполнение экспериментальной части.

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

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.I. Komarovskaya** conceptualised the study, drafted the manuscript, formulated the conclusions. **K.A. Lysko** conceptualized the research idea and formulated the conclusions.

Acknowledgements. The authors thank to O.V. Proskurina (Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products) for performing the experimental part.

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

Об авторах / Authors

Комаровская Елена Игоревна / Elena I. Komarovskaya

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9035-6072>

Лыско Ксения Андреевна, канд. техн. наук / **Ksenia A. Lysko**, Cand. Sci. (Techn.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-4276-4744>

Поступила 11.09.2025

После доработки 28.04.2026

Принята к публикации 19.06.2026

Received September 11, 2025

Revised April 28, 2026

Accepted June 19, 2026



Аттестация фармакопейного стандартного образца лиофилизированной IgE-содержащей сыворотки к аллергену пыльцы амброзии

Л.В. Невская , Н.Э. Петрова , В.К. Капитанова , Л.А. Гайдерова ,
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

✉ Невская Лариса Валерьевна; nevskaya@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Для оценки активности аллергенов методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) требуются стандартные образцы (СО) специфических сывороток, содержащих IgE-антитела к аллергену пыльцы амброзии полыннолистной. Однако международный и национальный стандарты такой сыворотки отсутствуют. Актуальной представляется разработка российского фармакопейного стандартного образца (ФСО) IgE-содержащей сыворотки к аллергену пыльцы амброзии.

ЦЕЛЬ. Аттестация кандидата в ФСО лиофилизированной IgE-содержащей сыворотки к аллергену пыльцы амброзии (ФСО IgE-Амб) и оценка возможности его применения для определения концентрации IgE и активности аллергена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Концентрацию аллергенспецифических IgE-антител в ФСО IgE-Амб определяли методом реверсивного аллергосорбентного теста (РЕАСТ) с помощью коммерческого набора реагентов российского производства. Подлинность ФСО IgE-Амб определяли согласно ОФС.1.7.2.0034.15 методом прямого ИФА. Испытания кандидата в ФСО по показателям качества «Описание», «Вода», «Однородность массы», «Растворимость», «Герметичность» проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ). Аллергенную активность оценивали методом конкурентного ИФА. Статистическую обработку данных проводили с использованием дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Аттестация кандидата в ФСО IgE-Амб проведена согласно утвержденной программе аттестации. Методом РЕАСТ определена аттестуемая характеристика ФСО IgE-Амб — концентрация специфических IgE-антител к аллергену пыльцы амброзии, составившая $27,02 \pm 4,6$ МЕ/мл (4-й класс). Подтверждена специфичность связывания ФСО IgE-Амб с аллергеном пыльцы амброзии полыннолистной. Результаты испытаний кандидата в ФСО по дополнительным показателям качества («Описание», «Вода», «Однородность массы», «Растворимость», «Герметичность») соответствовали требованиям ГФ РФ. Показана возможность использования ФСО IgE-Амб для определения концентрации IgE-антител в референс-сыворотках предприятия методом прямого ИФА и оценки активности аллергена пыльцы амброзии методом конкурентного ИФА. Коэффициенты вариации между известным и определенными с помощью ФСО значениями составили 4,7% для прямого ИФА и 8,0% для конкурентного ИФА.

ВЫВОДЫ. Впервые аттестован российский ФСО лиофилизированной IgE-содержащей сыворотки к аллергену пыльцы амброзии с установленной характеристикой — концентрацией специфических IgE-антител к аллергену пыльцы амброзии полыннолистной, определенной методом РЕАСТ. ФСО IgE-Амб соответствует требованиям ГФ РФ,

рекомендован для включения в Реестр фармакопейных стандартных образцов ГФ РФ и обеспечивает возможность стандартизации аллергенов и референс-сывороток в Российской Федерации.

Ключевые слова: аллерген пыльцы амброзии; аллергены; аллергенная активность; иммуноферментный анализ; реверсивный аллергосорбентный тест; стандартный образец; ФСО; IgE; антитела; лиофилизированная сыворотка; дисперсионный анализ; аттестация

Для цитирования: Невская Л.В., Петрова Н.Э., Капитанова В.К., Гайдера Л.А., Фадейкина О.В. Аттестация фармакопейного стандартного образца лиофилизированной IgE-содержащей сыворотки к аллергену пыльцы амброзии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(2):220–229. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-220-229>

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. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. При написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных. Упоминание в тексте конкретных торговых марок реагентов приведено исключительно в информационных и научно-практических целях и не является рекламной рекомендацией.

Certification of a pharmacopoeial reference standard of lyophilized IgE-containing serum to ragweed pollen allergen

Larisa V. Nevskaya , Nadezhda E. Petrova , Vera K. Kapitanova ,
Lidiya A. Gaiderova , Olga V. Fadeikina 

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

✉ Larisa V. Nevskaya; nevskaya@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The assessment of allergen activity by competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) requires reference standards (RS) of specific sera containing IgE antibodies to the common ragweed pollen allergen. However, neither an international nor a national standard for such serum is available. Therefore, the development of a Russian pharmacopoeial reference standard (PhRS) for IgE-containing serum to common ragweed pollen allergen is relevant.

AIM. This study aimed to certify a candidate for the pharmacopoeial reference standard of lyophilized IgE-containing serum to common ragweed pollen allergen (PhRS IgE-Amb) and to evaluate the feasibility of its use for determining IgE concentration and allergen activity.

MATERIALS AND METHODS. The concentration of allergen-specific IgE antibodies in the candidate for the PhRS IgE-Amb was determined by reverse allersorbent test (REAST) using a commercial reagent kit manufactured in Russia. The identity of the candidate for the PhRS IgE-Amb was determined according to General Pharmacopoeia Monograph 1.7.2.0034.15 by direct ELISA. Tests of the candidate for the PhRS IgE-Amb for the quality attributes (Description, Water, Mass homogeneity, Solubility, and Tightness) were conducted in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (SP RF). Allergenic activity was assessed by competitive ELISA. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA).

RESULTS. The candidate for the PhRS IgE-Amb was certified according to the approved certification program. The certified characteristic of the PhRS IgE-Amb, i.e., the concentration of specific IgE antibodies to common ragweed pollen allergen, was determined by the REAST method and found to be 27.02±4.6 IU/mL (class 4). The specificity of binding of the PhRS IgE-Amb to common ragweed pollen allergen was confirmed. The results of tests for additional quality

attributes (Description, Water, Mass homogeneity, Solubility, Tightness) met the requirements of the SP RF. The feasibility of using the PhRS IgE-Amb for determining the concentration of IgE antibodies in enterprise reference sera by direct ELISA and for assessing common ragweed pollen allergen activity by competitive ELISA was demonstrated. The coefficients of variation between the known values and those determined using the RS were 4.7% for direct ELISA and 8.0% for competitive ELISA.

CONCLUSIONS. For the first time, a Russian pharmacopoeial reference standard of lyophilized IgE-containing serum to common ragweed pollen allergen has been certified with the established characteristic — the concentration of specific IgE antibodies to common ragweed pollen allergen determined by REAST. The PhRS IgE-Amb complies with the requirements of the SP RF, is recommended for inclusion in the State Register of Reference Standards, and enables the standardization of allergens and reference sera in the Russian Federation.

Keywords: ragweed pollen allergen; allergens; allergenic activity; ELISA; reverse allergosorbent test; reference standard; PhRS; IgE; antibody; lyophilized serum; analysis of variance; certification

For citation: Nevskaya L.V., Petrova N.E., Kapitanova V.K., Gaiderova L.A., Fadeikina O.V. Certification of a pharmacopoeial reference standard of lyophilized IgE-containing serum to ragweed pollen allergen. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(2):220–229. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-220-229>

Funding. This study was conducted at 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 state registration No. 124022200103-5).

Disclosure. O.V. Fadeikina has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2025. The authors declare no conflict of interest. The authors were guided by considerations of the scientific value of the obtained material and declare impartiality in assessing of the obtained data. The mention of specific reagent brands in the text is provided for informational and scientific-practical purposes only and does not constitute an advertisement.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из главных показателей качества препаратов аллергенов является оценка их специфической активности. У большинства российских препаратов аллергенов для оценки этого показателя применяются кожные пробы (прик-тест)¹ [1, 2]. Кожные пробы проводят на пациентах с аллергическими заболеваниями, что представляет морально-этическую проблему, поскольку введение аллергена может быть опасным для здоровья (возможны местные кожные реакции и, крайне редко, системные осложнения — крапивница, анафилактический шок) [3, 4]. Отказ от испытаний на людях при оценке аллергенной активности является актуальной задачей. За последние годы предприняты значительные усилия по разработке альтернативных методов *in vitro*, позволяющих оценивать качество лекарственных препаратов без использования животных [5].

В настоящее время применяют разные методы иммуноанализа, основанные на ингибировании связывающей активности сывороточного иммуноглобулина E (IgE) человека, специфичного к исследуемому аллергену, включая конкурентный

иммуноферментный анализ (КИФА или ингибция ИФА) [6, 7]. Специфическую сыворотку для этого метода получают из крови пациентов с подтвержденным аллергическим заболеванием. Международные требования к концентрации аллергенспецифических IgE-антител в сыворотке крови не разработаны². Указание о том, что для исследований рекомендует-ся отбирать сыворотки с уровнем IgE-антител не менее 3-го класса (то есть сыворотки пациентов с выраженными клиническими проявлениями аллергического заболевания) имеется только в ОФС.1.7.2.0034.15³.

Для обеспечения единства и требуемой точности измерений в методиках рекомендуется использовать стандартные образцы (СО) — международные, национальные, фармакопейные и др. [7, 8]. В настоящее время существует 4 международных референс-сыворотки (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC), содержащих следующие специфические IgE-антитела: к аллергену грибов *Aspergillus fumigatus* (78/545); к аллергену пыльцы березы (76/525); к аллергену пыльцы ежи сборной (77/503); к аллергенам клещей *Dermatophagoides*

¹ ОФС.1.7.2.0040.18 Определение специфической (аллергенной) активности аллергенов и алергоидов методом кожных проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

² Guideline on allergen products: production and quality issues (EMA/CHMP/BWP/304831/2007). EMEA; 2007.

³ ОФС.1.7.2.0034.15 Определение подлинности аллергенов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

pteronysinus (77/584)⁴. Референс-сыворотка, содержащая IgE-антитела к аллергену пыльцы амброзии, отсутствует. Фармацевтические компании, выпускающие препараты аллергенов, для оценки их активности используют внутренние референс-образцы аллергенспецифических сывороток в жидком виде [1].

Данные о разработке в Российской Федерации СО сывороток, содержащих специфические IgE-антитела к определенному аллергену, отсутствуют. Ранее авторами разработана технология получения лиофилизированных форм концентрированных аллергенспецифических сывороток, которые могут быть использованы в качестве фармакопейных стандартных образцов (ФСО) со сроком годности не менее 7 лет [9]. По этой технологии впервые произведен кандидат в ФСО лиофилизированной IgE-содержащей сыворотки к аллергену пыльцы амброзии.

Цель работы — аттестация кандидата в ФСО лиофилизированной IgE-содержащей сыворотки к аллергену пыльцы амброзии (ФСО IgE-Амб) и оценка возможности его применения для определения концентрации IgE и активности аллергена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы:

- кандидат в ФСО — лиофилизированная IgE-содержащая сыворотка к аллергену пыльцы амброзии полыннолистной (ФСО IgE-Амб) (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), срок годности 7 лет [9];
- экспериментальная серия СО — лиофилизированная IgE-содержащая сыворотка к аллергену пыльцы амброзии (СО-Э IgE-Амб) (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), концентрация IgE-антител — 16,12 МЕ/мл (3-й класс, метод РЕАСТ), срок годности 7 лет [9];
- положительный контроль — контрольная аллергенспецифическая сыворотка крови человека, содержащая IgE-антитела к аллергену пыльцы амброзии (КС IgE-Амб), референс-сыворотка из набора реагентов «IgE-АТ-ИФТС» (АО «НПО «Микроген», Россия), срок годности 1 год;
- отрицательный контроль — сыворотка, не содержащая IgE-антитела к аллергену пыльцы амброзии (АО «НПО «Микроген», Россия);
- кандидат в ФСО аллергена пыльцы амброзии полыннолистной (ФСО АЛЛ-Амб), лиофилизат (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), срок годности 5 лет;

- СО аллергена пыльцы амброзии полыннолистной, лиофилизат, экспериментальная серия (СО-Э АЛЛ-Амб) (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), срок годности 5 лет;
- СО предприятия для оценки аллергенной активности аллергена пыльцы амброзии полыннолистной, жидкий, серия С1 (АО «НПО «Микроген», Россия), срок годности 2 года;
- биотинилированный аллерген w1 амброзии обыкновенной (*Ambrosia elatior*) (ООО «Компания Алкор Био», Россия, кат. № 300-29, кат. № 300-30-w1);
- аллерген из клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpte) для диагностики и лечения, серия С9Э (АО «НПО «Микроген», Россия);
- аллергоид пылевой овсяницы луговой (Pfes) для лечения, серия С280223 (АО «НПО «Микроген», Россия);
- набор реагентов для количественного иммуноферментного определения аллергенспецифических IgE-антител в сыворотке крови человека «АллергоИФА — специфические IgE» (ООО «Компания Алкор Био», Россия, кат. № 300-29);
- планшеты 96-луночные для ИФА, стрипованные, MaxiSorb (Thermo Fisher Scientific, кат. № 469264).

Реактивы и реагенты

IgE-антитела козы против IgE человека, меченные пероксидазой хрена (goat anti-human IgE peroxidase labeled, KPL, США, кат. № 3074-1004); карбонат-бикарбонатный буфер (КББ), капсулы (Sigma-Aldrich, США, кат. № С30-41); фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) (Gibco, США, кат. № 14200-075); субстрат тетраметилбензидин, ТМБ (KPL, США, кат. № 5120-0038); полисорбат 20 (BioFroxx, Германия, кат. № 1247).

Оборудование

Анализатор Multiscan GO с программным обеспечением (Thermo Fisher Scientific, Финляндия); термошейкер Innova 4230 (New Brunswick Scientific Co., США); перемешивающее устройство (встряхиватель) Vortex Genie 2 G-560E (Binder & Hobein AG, США); устройство для промывки микропланшет Hydroflex (Tecan Group Ltd., Австрия); весы электронные Ohaus AR3130 (OHAUS Corporation, США); дозаторы переменных объемов (Sartorius biohit, Финляндия).

Методы

Реверсивный аллергосорбентный тест (РЕАСТ). РЕАСТ использовали для установления

⁴ https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/sub_category_listing.aspx?category=Diagnostics&subcategory=Immunoglobulins+and+immune+sera

аттестуемой характеристики – количественного определения специфических IgE-антител к аллергену пыльцы амброзии – с помощью набора реагентов «АллергоИФА – специфические IgE» согласно инструкции по применению (рис. S1, опубликован на сайте журнала в Приложении 1⁵).

РЕАСТ основан на сэндвич-методе ИФА, особенность которого состоит в использовании жидких биотинилированных аллергенов. На первой стадии после внесения сывороток и жидких биотинилированных аллергенов в лунки Fc-фрагменты всех молекул IgE в сыворотке связываются с Fab-фрагментами сорбированных мышинных моноклональных антител, биотинилированный аллерген – с Fab-фрагментами IgE-антител, специфичных к данному аллергену (при их наличии в сыворотке крови). В лунки с калибраторами (разведения общего IgE) вносили анти-IgE-антитела, меченные биотином. На второй стадии добавляли конъюгат – стрептавидин-пероксидазу. В качестве индикатора использовали ТМБ [10]. Результаты регистрировали с помощью анализатора Multiscan GO.

Концентрацию аллергенспецифических IgE в ФСО IgE-Амб определяли в международных единицах (МЕ), где 1 МЕ/мл соответствует 2,4 нг IgE на 1 л, или 1 килоединице на 1 л (kU/L) [10, 11], и в классах (в виде интервалов концентрации IgE в МЕ/мл).

Для испытаний использовали 9 флаконов кандидата в ФСО IgE-Амб. Каждый флакон тестировали в 6 повторностях. Испытания проводили три оператора в разные дни.

Критерии приемлемости испытания

- Величина оптической плотности (ОП) фонового контроля – не более 0,12.
- Значение коэффициента вариации (CV) – не более 10% (один оператор) и не более 20% (разные операторы).
- Вычисленное значение концентрации IgE контрольной сыворотки (входит в состав набора) должно находиться в пределах от 1,0 до 1,9 МЕ/мл.

Метод ИФА. Показатель «Подлинность/Специфичность» определяли в соответствии с ОФС.1.7.2.0034.15⁶. ФСО АЛЛ-Амб, аллерген Dpte и аллергоид Pfes сорбировали в лунки

планшета в концентрации 1000 PNU/мл (protein nitrogen unit – единицы белкового азота)⁷. Сыворотки, специфичные к аллергену пыльцы амброзии (ФСО IgE-Амб и СО-Э IgE-Амб – препарат сравнения), восстанавливали в 1,0 мл воды и готовили серию последовательных двукратных разведений, которые вносили в лунки с вышеуказанными аллергенами (рис. S2, Приложение 1). Перекрестная реактивность должна отсутствовать: значения ОП сывороток в лунках с другими (неоднородными) аллергенами должны быть ниже, чем в лунках с одноименным аллергеном.

Критерии приемлемости испытания

- Величина ОП фонового контроля – не более 0,12.
- Величина ОП в лунках с аллергенспецифическими сыворотками без разведения – от 1,0 и выше.
- Значение CV между одноименными лунками – не более 10%.
- Результаты дисперсионного анализа (ANOVA) кривых «доза-ответ» для тестирования сывороток в лунках с одноименным аллергеном должны соответствовать следующим условиям: положительная зависимость между разведениями образцов и ОП, линейность и параллелизм кривых (табл. S1, Приложение 1).

Кулонометрический метод (метод Фишера).

Показатель «Вода» оценивали в соответствии с ОФС.1.2.3.0002.15 методом Фишера⁸.

Весовой метод. Показатель «Однородность дозирования» оценивали в соответствии с ОФС.1.4.2.0008⁹.

Метод свечения. Показатель «Герметичность» определяли в соответствии с ОФС.1.4.2.0025¹⁰.

Визуальный метод. Показатель «Растворимость» определяли в соответствии с ОФС.1.2.1.0005¹¹.

Метод конкурентного ИФА (кИФА). Показатель «Аллергенная/специфическая активность» оценивали методом кИФА (модификация АО «НПО «Микроген», Россия) [1] (рис. S3, Приложение 1). В лунках планшета сорбировали аллерген, далее вносили пробу – смесь аллергена и специфической сыворотки, содержащей IgE-антитела (рис. S1, Приложение 1). Определяемый аллерген в пробе конкурирует с сорбированным

⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-220-229-annex>

⁶ ОФС. 1.7.2.0034.15 Определение подлинности аллергенов Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁷ ОФС.1.7.2.0040.18 Определение специфической (аллергенной) активности аллергенов и аллергоидов методом кожных проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁸ ОФС.1.2.3.0002.15 Определение воды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

⁹ ОФС.1.4.2.0008 Однородность дозирования. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

¹⁰ ОФС.1.4.2.0025 Определение герметичности упаковки. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

¹¹ ОФС.1.2.1.0005 Растворимость. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

аллергеном за связывание с антителами, и активность аллергена обратно пропорциональна его концентрации в пробе¹².

В качестве стандарта использовали СО предприятия (АО «НПО «Микроген», Россия) – жидкий аллерген пыльцы амброзии. СО предприятия сорбировали в концентрации 1000 PNU/мл. Ингибирующие растворы готовили в 6 последовательных разведениях СО предприятия и образца (СО-Э АЛЛ-Амб), к которым добавляли аллергенспецифические сыворотки: 1) контрольную сыворотку предприятия (КС IgE-Амб); 2) ФСО IgE-Амб. Специфическую активность выражали в единицах аллергенной активности – ЕАА/мл (100000 ЕАА соответствуют разведению, вызывающему кожную реакцию в виде папулы 8 мм у сенсibilизированных пациентов)¹³.

Критерии приемлемости испытания

- Величина ОП фонового контроля – не более 0,12.
- Величина ОП в лунках с минимальной концентрацией аллергена – от 0,80 и выше.
- CV между значениями аллергенной активности, полученными с помощью разных сывороток, не должен превышать 25%.
- Результаты дисперсионного анализа (ANOVA) кривых «доза-ответ» должны соответствовать следующим условиям: отрицательная зависимость между разведениями аллергена и величиной ОП, линейность и параллелизм кривых (согласно подразделу «Метод ИФА»).

Статистическая обработка данных. Значение аттестованной характеристики определяли как среднее арифметическое всех повторностей. Статистический анализ выполняли с использованием программ Multiscan Scanit RE, Microsoft Office Excel, рассчитывая среднеарифметическое значение (*M*), стандартное отклонение (*SD*) и коэффициент вариации (*CV*). Статистический анализ кривых проводили с использованием программы PLA 2.0 (дисперсионный анализ методом параллельных линий)¹⁴.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все испытания кандидата в ФСО лиофилизированной аллергенспецифической сыворотки, содержащей IgE-антитела к аллергену пыльцы амброзии (ФСО IgE-Амб), проведены согласно утвержденной программе аттестации.

Аттестуемая характеристика ФСО IgE-Амб

Аттестуемой характеристикой являлась концентрация аллергенспецифических IgE-антител, выраженная в МЕ/мл и в классах (табл. 1)¹⁵. Перевод значений IgE в классы необходим для сравнения, поскольку уровень IgE-антител одной и той же сыворотки, установленный с помощью разных наборов реагентов, может отличаться [12], тогда как в классах эти значения совпадают.

Аттестованное значение кандидата в ФСО IgE-Амб – концентрация специфических

Таблица 1. Концентрация аллергенспецифических IgE-антител в сыворотке (МЕ/мл) с указанием класса
Table 1. Concentration of allergen-specific IgE antibodies in serum (IU/mL) and class

Концентрация IgE, МЕ/мл (кЕ/л)* IgE concentration, IU/mL (kU/L)*	Класс Class	Оценка Assessment
0–0,35	0	Отсутствует / <i>Absent</i>
0,351–0,69	1	Низкий / <i>Low</i>
0,70–3,49	2	Средний / <i>Medium</i>
3,50–17,49	3	Высокий / <i>High</i>
17,50–49,99	4	Очень высокий / <i>Very high</i>
50,0–100,0	5	Насыщенно высокий / <i>Extremely high</i>
Выше 100,0 / <i>Above 100.0</i>	6	Экстремально высокий / <i>Exceedingly high</i>

Таблица составлена авторами по данным источников, представленных в сноске¹⁶ / The table was compiled by the authors based on data from the sources cited in footnote¹⁶

Примечание. * – кЕ/л – килоединица на 1 л (эквивалентна МЕ/мл).

Note. *, kU/L, kilo-units per liter (equivalent to IU/mL).

¹² Спирина ЛВ. Иммунохимические методы. ИФА – иммуноферментный анализ. <https://en.ppt-online.org/202167>

¹³ ОФС.1.7.2.0040.18 Определение специфической (аллергенной) активности аллергенов и алергоидов методом кожных проб. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

¹⁴ PLA 2.0. <https://www.stegmanns.com>

¹⁵ <https://helix.ru/kb/item/21-622>

<https://dermnetnz.org/topics/immunoglobulin-e-tests>

¹⁶ <https://helix.ru/kb/item/21-622>

<https://dermnetnz.org/topics/immunoglobulin-e-tests>

IgE-антител к аллергену пыльцы амброзии — была определена с помощью набора реагентов «АллергоИФА — специфические IgE» (метод РЕАСТ), который используется для оценки сенсибилизации пациентов к различным аллергенам [13]. Выбор данного набора обусловлен тем, что это первая российская разработка, у которой подтверждена высокая специфичность по сравнению с эталонной для определения IgE тест-системой ImmunoCAP, алергочип (коэффициент корреляции — 0,86–0,99) [2, 10, 14]. Набор реагентов «АллергоИФА — специфические IgE» показал хорошую корреляцию с набором «Тест-система иммуноферментная для определения аллергенспецифических IgE-антител человека IgE-АТ-ИФТС»¹⁷ (метод ИФА), в котором результаты выражаются к классам¹⁸ (интервалы концентраций, связанных с тяжестью заболевания) [2].

Для установления значения аттестуемой характеристики (концентрации IgE-антител в МЕ/мл) рассчитывали *M*, *SD*, *CV* и класс (табл. 2).

Аттестованное значение аллергенспецифических IgE-антител составило 27,02±4,60 МЕ/мл

(4-й класс), что соответствовало рекомендованным значениям (не ниже 3-го класса)¹⁹. Полученные результаты соответствовали критериям приемлемости.

Оценка подлинности ФСО IgE-Амб

Определение подлинности проводили согласно программе аттестации по ОФС.1.7.2.0034.15 методом прямого ИФА²⁰. Результаты испытаний представлены на рисунке 1.

По результатам испытаний подтверждена специфичность связывания исследуемых СО (ФСО IgE-Амб и СО-Э IgE-Амб) с одноименным аллергеном — аллергеном пыльцы амброзии полыннолистной (ФСО АЛЛ-Амб). Перекрестные реакции с аллергенами других наименований (*Dpte* и *Pfes*) — отсутствовали. Полученные результаты соответствовали критериям приемлемости²¹. Вычисленная относительно ФСО концентрация IgE-антител в образце СО-Э IgE-Амб составила 16,12 МЕ/мл, что сопоставимо с известным значением, полученным методом РЕАСТ (15,08 МЕ/мл), коэффициент вариации между значениями составил 4,7%.

Таблица 2. Концентрация IgE-антител к аллергену пыльцы амброзии, определенная разными операторами

Table 2. Concentration of IgE antibodies to the ragweed pollen allergen determined by different operators

Показатель <i>Parameter</i>	Концентрация IgE-антител (МЕ/мл) <i>IgE antibody concentration (IU/mL)</i>		
	Оператор 1 <i>Operator 1</i>	Оператор 2 <i>Operator 2</i>	Оператор 3 <i>Operator 3</i>
Концентрация IgE (МЕ/мл) / <i>IgE concentration (IU/mL)</i>	26,69	26,41	27,97
SD	0,95	0,90	1,92
CV, %	3,55	3,40	6,87
ОП фоновых лунок / <i>OD of blank wells</i>	0,002	0,002	0,002
Концентрация IgE в КС (МЕ/мл) / <i>IgE concentration in CS (IU/mL)</i>	1,34	1,43	1,54
Аттестуемое значение, <i>M</i> ±3 <i>SD</i> (МЕ/мл / класс) <i>Certified value, M</i> ±3 <i>SD</i> (IU/mL / class)	27,02±4,60 / 4-й класс 27,02±4,60 / class 4		

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

Примечание. КС — контрольная сыворотка; ОП — оптическая плотность; SD — стандартное отклонение; CV — коэффициент вариации.

Note. CS, control serum; OD, optical density; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

¹⁷ Отчет по НИР ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2019–2023 гг. «Разработка перспективных направлений совершенствования экспертизы качества, эффективности и безопасности биологических лекарственных препаратов и стандартизации методов их оценки».

¹⁸ Инструкция к набору реагентов «Тест-система иммуноферментная для определения аллергенспецифических IgE-антител человека IgE-АТ-ИФТС». АО «НПО «Микроген».

¹⁹ ОФС.1.7.2.0034.15 Определение подлинности аллергенов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

²⁰ Там же.

²¹ Симушкин СВ. Методические разработки по специальному курсу Дисперсионный анализ. Казань: Казанский государственный университет; 1998. ОФС.1.1.0013 Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

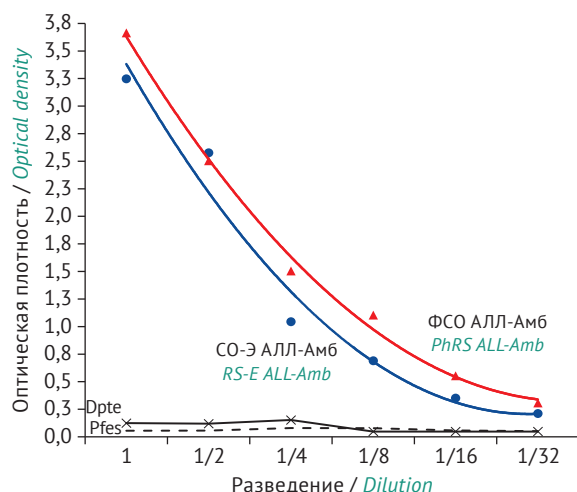


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Результаты оценки подлинности/специфичности исследуемых образцов. ФСО АЛЛ-Амб – кандидат в фармакопейный стандартный образец аллергена пыльцы амброзии полыннолистной (красная линия); СО-Э АЛЛ-Амб – стандартный образец аллергена пыльцы амброзии полыннолистной, лиофилизат, экспериментальная серия (синяя линия); Dpte – аллерген из клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* (черная линия); Pfes – аллергоид овсяницы луговой (черная пунктирная линия).

Fig. 1. Results of authenticity/specificity assessment of the tested samples. PhRS ALL-Amb, candidate for pharmacopoeial reference standard of common ragweed pollen allergen (red line); RS-E ALL-Amb, reference standard of common ragweed pollen allergen, lyophilizate, experimental series (blue line); Dpte, allergen from the mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (black line); Pfes, meadow fescue allergoid (black dashed line).

Дополнительные показатели качества ФСО IgE-Амб

В соответствии с программой аттестации были проведены испытания ФСО IgE-Амб по следующим дополнительным показателям: «Описание», «Вода», «Однородность массы», «Растворимость», «Герметичность». Необходимость проведения испытаний по этим показателям обусловлена требованиями ВОЗ к стандартным образцам и ОФС.1.4.1.0031²². Все результаты испытаний соответствовали нормам, приведенным в таблице 3.

Применение ФСО IgE-Амб для оценки аллергенной активности методом конкурентного ИФА

Для проведения исследования использовали два вида раствора для ингибиции: 1 – смесь

аллергена и контрольной сыворотки (КС IgE-Амб), 2 – смесь аллергена и ФСО IgE-Амб. Для статистической обработки результатов использовали программу PLA 2.0 (табл. 4). Полученные результаты соответствовали критериям приемлемости и показали, что ФСО IgE-Амб может быть использован для оценки активности аллергенов методом ИФА.

Таким образом, проведена аттестация первого российского ФСО IgE-содержащей сыворотки, международные аналоги которого отсутствуют. Аттестуемая характеристика – концентрация IgE-антител к аллергену пыльцы амброзии – установлена методом РЕАКТ с помощью российского набора реагентов, имеющего высокую корреляцию с аллергочипом ImmunoCAP, обладающим значительно более высокой стоимостью [2, 10]. ФСО IgE-Амб имеет больший срок годности (7 лет) по сравнению с аналогом российского производства – жидкой референс-сывороткой (1 год)²³. По истечении 7 лет планируется проводить ежегодный ретест ФСО для продления срока годности до 10 лет, как рекомендовано для международных СО²⁴. ФСО IgE-Амб может быть использован для аттестации СО предприятий – как препаратов аллергенов, так и аллергенспецифических референс-сывороток.

Выводы

1. Аттестуемая характеристика – концентрация специфических IgE-антител к аллергену пыльцы амброзии полыннолистной, установленная методом РЕАКТ, составила $27,02 \pm 4,6$ МЕ/мл (4-й класс).
2. ФСО IgE-Амб соответствует требованиям, предъявляемым к стандартным образцам, и может быть использован для определения концентрации IgE-антител в референс-сыворотках предприятия методом прямого ИФА, а также для оценки специфической (аллергенной) активности методом конкурентного ИФА.
3. По результатам аттестации ФСО IgE-Амб рекомендован для включения в Реестр фармакопейных стандартных образцов ГФ РФ, что позволит проводить стандартизацию аллергенов и референс-сывороток в Российской Федерации.

²² Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards, Annex 2, TRS No 932. WHO; 2026.

ОФС.1.4.1.0031 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

²³ Паспорт на набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для определения аллергенспецифических IgE-антител IgE-АТ-ИФТС». АО «НПО «Микроген».

²⁴ Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards, Annex 2, TRS No 932. WHO; 2026.

Таблица 3. Результаты испытаний по дополнительным показателям кандидата в фармакопейный стандартный образец лиофилизированной IgE-содержащей сыворотки к аллергену пыльцы амброзии полыннолистной (ФСО IgE-Амб)
Table 3. Results of additional tests for the candidate pharmacopoeial reference standard of lyophilized IgE-containing serum to common ragweed pollen allergen (PhRS IgE-Amb)

Показатель (метод) <i>Parameter (method)</i>	Требование <i>Requirement</i>	Результат <i>Result</i>
Описание (визуальный) <i>Description (visual)</i>	Леофилизат должен быть в виде таблетки от светло-желтого до темно-желтого цвета. Восстановленный раствор: непрозрачная жидкость от светло-желтого до темно-желтого цвета, допустимо выпадение небольшого осадка <i>The lyophilizate should be a light yellow to dark yellow tablet. Reconstituted solution: opaque liquid, light yellow to dark yellow, a small amount of precipitate is acceptable</i>	Леофилизат — таблетка светло-желтого цвета. Восстановленный раствор: непрозрачная жидкость желтого цвета <i>Lyophilizate is a light yellow tablet. Reconstituted solution: opaque yellow liquid</i>
Подлинность (ИФА) <i>Identity (ELISA)</i>	Оптическая плотность для кандидата в ФСО IgE-Амб без разведения в лунках с аллергеном пыльцы амброзии полыннолистной должна быть выше 1,0 <i>Optical density for the candidate for the PhRS IgE-Amb without dilution in wells with common ragweed pollen allergen should be higher than 1.0</i>	3,66
Однородность массы (весовой) <i>Uniformity of mass (weight)</i>	Отклонение массы содержимого 10 флаконов от средней массы не должно превышать ±10%. Не более 2 флаконов могут иметь массу содержимого, отличающуюся от средней массы более чем на ±10%, но не более чем на ±20% <i>Deviation of the content mass of 10 vials from the average mass should not exceed ±10%. No more than 2 vials may have a content mass that differs from the average mass by more than ±10%, but not more than ±20%</i>	1,5
Герметичность (метод свечения) <i>Leakproofness (glow method)</i>	Должно наблюдаться голубое свечение <i>A blue glow should be observed</i>	Наблюдается голубое свечение <i>A blue glow is observed</i>
Растворимость (визуальный) <i>Solubility (visual)</i>	Содержимое флакона растворяется в воде в течение 1 мин <i>Vial contents dissolve in water within 1 min</i>	<1 мин <i><1 min</i>
Вода (метод Фишера) <i>Water (Fischer's method)</i>	Не более 3,0% <i>Not more than 3.0%</i>	0,57

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

Таблица 4. Активность стандартного образца аллергена пыльцы амброзии полыннолистной методом конкурентного ИФА
Table 4. Activity of the reference standard of common ragweed pollen allergen by competitive ELISA

Параметр <i>Parameter</i>	Аллергенспецифическая сыворотка / <i>Allergen-specific serum</i>	
	КС IgE-Амб / <i>CS IgE-Amb</i>	ФСО IgE-Амб / <i>PhRS IgE-Amb</i>
Активность (ЕАА/мл) / <i>Activity (UAA/mL)</i>	345204	306245
CV, %	8,0	

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

Примечание. КС IgE-Амб — контрольная аллергенспецифическая сыворотка крови человека, содержащая IgE-антитела к аллергену пыльцы амброзии; ФСО IgE-Амб — фармакопейный стандартный образец лиофилизированной IgE-содержащей сыворотки к аллергену пыльцы амброзии полыннолистной; ЕАА — единицы аллергенной активности; CV — коэффициент вариации.
Note. CS IgE-Amb, control allergen-specific human serum containing IgE antibodies to ragweed pollen allergen; PhRS IgE-Amb, pharmacopoeial reference standard of lyophilized IgE-containing serum to common ragweed pollen allergen; UAA, units of allergenic activity; CV, coefficient of variation.

Литература/References

1. Саканян ЕИ, Ясная МА, Вуль ВФ и др. Лекарственные препараты пыльцевых аллергенов: современные аспекты стандартизации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023; 23(3–1):367–78. Sakanyan EI, Yasnaya MA, Vul VF, et al. Pollen allergen products: Current standardisation issues. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2023;23(3–1):367–78 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-367-378>

2. Невская ЛВ, Капитанова ВК, Петрова НЭ. Сравнительный анализ современных методов диагностики аллергических реакций немедленного типа. *Иммунология.* 2020;41(4):363–9. Nevskaya LV, Kapitanova VK, Petrova NE. Comparative analysis of modern methods for diagnostics of immediate allergic reactions. *Immunologiya.* 2020;41(4):363–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-363-369>

3. Гаджимагомедова ШС, Гебекова МБ, Маликова МД. Морально-этические проблемы проведения клинических испытаний и экспериментов на человеке. *Образование и право.* 2023;(10):182–6. Gadzhimagomedova ShS, Gebekova MB, Malikova MD. Moral and ethical problems of conducting clinical trials and experiments on humans. *Education and Law.* 2023;(10):182–6 (In Russ.). EDN: [XMPSLK](#)

4. Балаболкин ИИ, Мачарадзе ДШ. Кожные пробы: показания и противопоказания. *Вопросы современной педиатрии.* 2013;12(3):31–7. Balabolkin II, Macharadze DSh. Skin tests: Indications and contraindications. *Current Pediatrics.* 2013;12(3):31–7 (In Russ.). EDN: [RASZGX](#)

5. Гайдерова ЛА, Алпатова НА, Головинская ОВ и др. Реализация концепции 3Rs при контроле качества биологических

- лекарственных препаратов: современное состояние и перспективы (обзор). *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2025;13(2):229–40. Gayderova LA, Alpatova NA, Golovinskaya OV, et al. Implementation of the 3Rs concept in quality control of biologicals: Status and prospects (review). *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2025;13(2):229–40 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2025-13-2-229-240>
6. Zimmer J, Vieths S, Kaul S. Standardization and regulation of allergen products in the European Union. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2016;16(3):1621. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0599-4>
 7. Zimmer J, Bridgewater J, Ferreira F, et al. The history, present and future of allergen standardization in the United States and Europe. *Front Immunol*. 2021;12:725831. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.725831>
 8. Комаровская ЕИ, Фадейкина ОВ, Лыско КА и др. Аттестация фармакопейного стандартного образца для оценки специфической активности адсорбированного столбнячного анатоксина на морских свинках. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(2):182–92. Komarovskaya EI, Fadeikina OV, Lysko KA, et al. Certification of a pharmacopoeial reference standard for potency testing of adsorbed tetanus toxoid in guinea pigs. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(2):182–92 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-2-182-192>
 9. Невская ЛВ, Воропаев АА, Фадейкина ОВ и др. Способ получения лиофилизированной формы стандартного образца сыворотки, содержащего аллергенспецифический иммуноглобулин Е (варианты). Патент Российской Федерации № 2802333; 2022. Nevskaya LV, Voropaev AA, Fadeikina OV, et al. Method of obtaining lyophilized form of serum reference sample containing allergen-specific immunoglobulin E (versions). Patent of the Russian Federation No. 2802333; 2022 (In Russ.). EDN: [OGSUMA](https://ojs.suma.ru)
 10. Кочиш ЛТ, Мухортых ОЮ, Иванова НА, Кузьмина ГА. Сравнительная характеристика тест-системы «АллергоИФА – специфические IgE» ООО «Компания АлкорБио» и «ImmuCap» фирмы Phadia. *Справочник заведующего КДЛ*. 2012;(5):37–43. Kochish LT, Mukhortykh OYu, Ivanova NA, Kuzmina GA. Comparative characteristics of the test system “AllergoIFA – distinctive IgE” of AlkorBio Company LLC and “ImmuCap” of Phadia. *Handbook of the Head of the Clinical Diagnostic Laboratory*. 2012;(5):37–43 (In Russ.). EDN: [QBPCNR](https://ojs.suma.ru)
 11. Мокроносова МА. Диагностическое значение уровня общего IgE, основного маркера аллергической патологии. *Лабораторная служба*. 2015;4(3):10–4. Mokronosova MA. Diagnostic value of serum total IgE the primary marker of allergic diseases. *Laboratory Service*. 2015;4(3):10–4 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/labs20154310-14>
 12. Filep S, Tsay A, Valies L, et al. A multi-allergen standard for calibration of immunoassay: CREATE principles applied to eight purified allergens. *Allergy*. 2012;67(2):235–41. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02750.x>
 13. Козлова ЯИ, Васильев НЮ, Фролова ЕВ и др. Спектр сенсibilизации к аэроаллергенам как один из факторов риска неконтролируемого течения тяжелой бронхиальной астмы. *Российский аллергологический журнал*. 2023;20(3):275–86. Kozlova Yal, Vasiliev NYu, Frolova EV, et al. Spectrum of sensitization to aero-allergens as one of the risk factors for uncontrolled severe asthma. *Russian Journal of Allergy*. 2023;20(3):275–86 (In Russ.). <https://doi.org/10.36691/RJA15043>
 14. Литовкина АО, Бязрова МГ, Смольников ЕИ и др. Особенности молекулярного профиля сенсibilизации у пациентов с аллергией на пыльцу березы и перекрестной пищевой аллергией к PR-10 белкам. *Российский аллергологический журнал*. 2023;20(4):464–75. Litovkina AO, Byazrova MG, Smolnikov EV, et al. Characteristics of the molecular sensitization profiles in patients with birch pollen allergy and cross-reactive food allergy to PR-10 proteins. *Russian Journal of Allergy*. 2023;20(4):464–75 (In Russ.). <https://doi.org/10.36691/RJA16901>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликовано Приложение 1. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-220-229-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Л.В. Невская** — разработка программы аттестации, проведение экспериментальных исследований, анализ и статистическая обработка данных, оформление и интерпретация результатов; написание текста рукописи, формулировка выводов; **Н.Э. Петрова, В.К. Капитанова** — проведение экспериментальных исследований, интерпретация результатов, формулировка выводов, анализ данных литературы; **Л.А. Гайдерова** — обсуждение программы аттестации, анализ результатов исследования, редактирование выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **О.В. Фадейкина** — утверждение программы аттестации, анализ результатов исследования, редактирование текста рукописи.

Supplementary information. Supplementary material 1 is available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-220-229-annex>

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **L.V. Nevskaya** designed the certification program, conducted experimental studies, performed statistical data analysis, organized and interpreted the results, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **N.E. Petrova**, and **V.K. Kapitanova** conducted experimental studies, interpreted the results, formulated the conclusions, and analyzed the literature data. **L.A. Gaiderova** discussed the certification program, analyzed the study results, edited the conclusions, and approved the final version of the article for publication. **O.V. Fadeikina** approved the certification program, analyzed the study results, and edited the manuscript text.

Об авторах / Authors

Невская Лариса Валерьевна, канд. биол. наук / **Larisa V. Nevskaya**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5371-8532>

Петрова Надежда Эдуардовна, канд. биол. наук / **Nadezhda E. Petrova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7333-1076>

Капитанова Вера Константиновна / **Vera K. Kapitanova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8422-3452>

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук / **Lidiya A. Gaiderova**, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук / **Olga V. Fadeikina**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

Поступила 06.11.2025

После доработки 05.05.2026

Принята к публикации 19.06.2026

Received November 6, 2025

Revised May 5, 2026

Accepted June 19, 2026



Липоолигосахарид в цельноклеточных коклюшных вакцинах: корреляция его содержания с параметрами специфической безопасности у мышей

И.А. Алексеева , О.В. Шаповалова , Г.А. Сапожникова ,
Н.П. Неугодова , Д.Н. Лепихова , И.В. Ибрагимхалилова

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

✉ Алексеева Ирина Андреевна; alekseevai@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Реактогенность цельноклеточных коклюшных вакцин (ЦКВ) в основном обусловлена присутствием липоолигосахаридов (ЛОС) — бактериального эндотоксина (БЭ) наружной мембраны *Bordetella pertussis*. Оценка содержания ЛОС в ЦКВ и его корреляции со специфической безопасностью позволит определить приемлемый уровень ЛОС, не усиливающий реактогенность.

ЦЕЛЬ. Определение содержания липоолигосахаридов в цельноклеточных коклюшных вакцинах и установление корреляции с параметрами специфической безопасности у мышей (изменением массы тела и показателем специфической безопасности).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Исследовали экспериментальные серии ЦКВ из производственных (38, 475, 703) и циркулирующих штаммов *B. pertussis* (1-20, 2-20, 16-16, 25-16, 28(1)-18, 30-18, 33-18), выделенных от больных коклюшем детей. Содержание БЭ определяли гел-тестом и турбидиметрическим методом. Параметры специфической безопасности оценивали через 24 ч и 7 сут после введения препарата по изменению массы тела аутобредных мышей обоего пола, а также по значению показателя специфической безопасности (%).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Определено содержание БЭ на протяжении следующих сроков хранения: 1 год после изготовления ЦКВ (до сведения ЦКВ с другими компонентами АКДС-вакцины); от 1 до 2,5 года (срок годности ЦКВ в составе АКДС-вакцины); от 2,5 до 6 лет (после истечения срока годности). Средние значения содержания БЭ в ЦКВ из циркулирующих штаммов при хранении 1 год и 1–2,5 года составили 41872,9–70576,0 ЕЭ/мл; в ЦКВ из производственного штамма при хранении 1–2,5 года — 43980,6 ЕЭ/мл. В вакцинах с продолжительностью хранения 2,5–6 лет средние значения БЭ составляли 1353,8–26655,0 ЕЭ/мл. Установлен широкий диапазон значений содержания БЭ в изготовленных сериях: от <1000–1270 ЕЭ/мл (штамм 30-18) до 36430–94270 ЕЭ/мл (штамм 703). Показатели специфической безопасности образцов, кроме свежизготовленных 16-16 и 33-18, составили >60%. Установлена обратная корреляционная связь умеренной силы между содержанием БЭ и изменением массы тела мышей и показателем специфической безопасности.

ВЫВОДЫ. Содержание БЭ в образцах ЦКВ с продолжительностью хранения 1 год и 1–2,5 года статистически не различалось. Показатели специфической безопасности образцов (>60%) свидетельствуют о соответствии уровня БЭ требованиям безопасности. Обратная корреляция между содержанием БЭ (*in vitro*) и показателем специфической безопасности (*in vivo*) подтверждает роль ЛОС в специфической токсичности препарата, что обосновывает актуальность дальнейшего изучения его уровня в штаммах *B. pertussis* и влияния на безопасность ЦКВ.

Ключевые слова: коклюш; *Bordetella pertussis*; цельноклеточная коклюшная вакцина; липоолигосахарид; бактериальный эндотоксин; циркулирующие штаммы; ЛАЛ-тест; ТАЛ-тест; реактогенность; специфическая безопасность

Для цитирования: Алексеева И.А., Шаповалова О.В., Сапожникова Г.А., Неугодова Н.П., Лепихова Д.Н., Ибрагимхалилова И.В. Липоолигосахарид в цельноклеточных коклюшных вакцинах: корреляция его содержания с параметрами специфической безопасности у мышей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(2):230–240. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-230-240>

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.

Lipooligosaccharide in whole-cell pertussis vaccines: Correlation of its content with specific safety parameters in mice

Irina A. Alekseeva , Olga V. Shapovalova , Galina A. Sapozhnikova ,
Nataliia P. Neugodova , Darya N. Lepikhova , Ilkhamya V. Ibragimkhalilova 

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

✉ Irina A. Alekseeva; alekseevai@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The reactogenicity of whole-cell pertussis vaccines (wPV) is largely attributable to the presence of lipooligosaccharide (LOS), a bacterial endotoxin (BE) from the outer membrane of *Bordetella pertussis*. Assessing the LOS content in wPV and its correlation with specific safety parameters would help establish an acceptable LOS level that does not increase reactogenicity.

AIM. This study aimed to determine the lipooligosaccharide content in whole-cell pertussis vaccines and establish its correlation with specific safety parameters in mice (body weight change and specific safety index).

MATERIALS AND METHODS. Experimental batches of wPV manufactured from production strains (38, 475, 703) and from *B. pertussis* circulating strains (1-20, 2-20, 16-16, 25-16, 28(1)-18, 30-18, 33-18), isolated from children with pertussis, were studied. BE content was measured using the gel-clot test and the turbidimetric method. Specific safety parameters were assessed 24 hours and 7 days after administration by monitoring body weight changes in outbred mice of both sexes and by calculating the specific safety index (%).

RESULTS. BE content was determined at three time intervals: within 1 year after wPV manufacture (prior to combining with other diphtheria, tetanus, and pertussis (DTP) vaccine components); from 1 to 2.5 years (shelf life of wPV as part of the DTP vaccine); and from 2.5 to 6 years (after expiry). Mean BE content in wPV from circulating strains stored for 1 year and for 1–2.5 years ranged from 41,872.9 to 70,576.0 EU/mL; in wPV from the production strain stored for 1–2.5 years, it was 43,980.6 EU/mL. Vaccines stored for 2.5–6 years showed mean BE values ranging from 1353.8 to 26,655.0 EU/mL. A wide range of BE content was observed across manufactured batches, varying from <1000–1270 EU/mL (strain 30-18) to 36,430–94,270 EU/mL (strain 703). Specific safety index values for all samples, except for the freshly prepared 16-16 and 33-18, were >60%. A moderate inverse correlation was found between BE content and both mouse body weight change and the specific safety index.

CONCLUSIONS. BE content did not differ statistically between wPV samples stored for 1 year and those stored for 1–2.5 years. The specific safety index values (>60%) indicate that the BE levels comply with safety requirements. The inverse correlation between BE content (*in vitro*) and the specific safety index (*in vivo*) confirms the role of LOS in the specific toxicity of the vaccine, supporting further investigation into its levels in *B. pertussis* strains and its impact on wPV safety.

Keywords: pertussis; *Bordetella pertussis*; whole-cell pertussis vaccine; lipooligosaccharide; bacterial endotoxin; circulating strains; LAL test; TAL test; reactogenicity; specific safety

For citation: Alekseeva I.A., Shapovalova O.V., Sapozhnikova G.A., Neugodova N.P., Lepikhova D.N., Ibragimkhalilova I.V. Lipooligosaccharide in whole-cell pertussis vaccines: Correlation of its content with specific safety parameters in mice. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(2):230–240. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-230-240>

Funding. This study was conducted at 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 state registration No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Коклюш, высококонтагиозная инфекция верхних дыхательных путей, вызываемая *Bordetella pertussis*, остается одной из основных причин детской заболеваемости [1, 2]. Летальность от коклюша у новорожденных составляет от 1 до 3%, что обуславливает высокую значимость заболевания для практического здравоохранения [3–5].

Для защиты от коклюшной инфекции применяют цельноклеточную коклюшную вакцину (ЦКВ), которая за время использования зарекомендовала себя как высокоэффективный препарат. Однако местные и системные нежелательные явления, регистрируемые после иммунизации ЦКВ (боль, отек, покраснение места введения препарата, повышение температуры тела) [6], послужили поводом для ограничения ее широкого использования в развитых странах (США, Япония, Великобритания, Германия и др.). Один из важнейших факторов реактогенности ЦКВ – липоолигосахарид (ЛОС) – бактериальный эндотоксин (БЭ) наружной мембраны *B. pertussis*, обуславливающий эндотоксическую активность, аналогичную таковой у энтеробактерий [7, 8]. Помимо этого, ЛОС проявляет адъювантные свойства и участвует в патогенезе коклюшной инфекции, стимулируя иммунный ответ на антигены вакцины. Таким образом, ЛОС влияет как на протекание поствакцинального периода, так и на формирование иммунитета [9]. Поэтому актуальны исследования по определению безопасного диапазона содержания ЛОС в ЦКВ, не повышающего реактогенность, но сохраняющего иммуномодулирующие свойства.

В настоящее время имеются единичные публикации по оценке содержания ЛОС в зарубежных АКДС-вакцинах с цельноклеточным коклюшным компонентом [10]. В Российской Федерации проведено исследование содержания БЭ в препаратах ЛОС, полученных из бактериальной массы *B. pertussis* и из супернатанта культуральной среды [11]. Данные об уровне БЭ в отдельных штаммах *B. pertussis*, в том числе вакцинных, от-

сутствуют. В связи с этим представляло интерес проведение исследования по определению содержания БЭ в ЦКВ, изготовленных из разных штаммов, и установлению связи между уровнем БЭ и основным показателем качества вакцин – специфической безопасностью.

Цель работы – определение содержания липоолигосахаридов в цельноклеточных коклюшных вакцинах и установление корреляции с параметрами специфической безопасности у мышей (изменением массы тела и показателем специфической безопасности).

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи: выбор метода определения БЭ, отработка условий проведения испытания по определению БЭ, изготовление экспериментальных серий ЦКВ из штаммов *B. pertussis*, оптимизация процедуры подготовки образцов ЦКВ и определение в них содержания БЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Штаммы. Использованы производственные штаммы *B. pertussis* 38, 475, 703 и изоляты циркулирующих штаммов 1-20, 2-20, 16-16, 25-16, 28(1)-18, 30-18, 33-18, выделенные от детей, больных коклюшем. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России). Из каждого штамма согласно регламенту производства коклюшной вакцины № 136-69 были изготовлены экспериментальные серии ЦКВ (испытываемые образцы). Бактериальную культуру подвергали воздействию формальдегида, после чего в смыв культуры вносили консервант тиомерсал.

Экспериментальные животные. Работа выполнена на аутбредных мышах (самцы, самки; возраст 3,5–4 нед.) массой 15±1 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России». Мышей содержали в стандартных условиях

вивария со свободным доступом к воде и корму; ежедневно контролировали их состояние. Эвтаназию животных проводили с использованием специальной камеры с углекислым газом. Исследования на животных выполняли в соответствии с нормативными требованиями¹. Проведение исследования было одобрено на заседании локального этического комитета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол заседания № 14 от 20.10.2025).

Методы

Определение бактериального эндотоксина в испытуемых образцах. Для выбора метода определения БЭ использовали наборы с ЛАЛ/ТАЛ-реактивом и контрольным стандартом эндотоксина (КСЭ): лизат амёбоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реактив «PYROSTAR ES-F», Wako Chemicals USA, США, кат. № WPEK4-50025, WPEK4-5003, WPEK4-20015) и лизат амёбоцитов мечехвоста *Tachypleus tridentatus* (ТАЛ-реактив, BioEndo Technology, Китай, кат. № KT0828S). Для разведения образцов использовали воду для теста по определению БЭ (БЭТ) (ООО «Альгимед Техно», Россия, кат. № ALW-50). Все реактивы соответствовали требованиям ОФС.1.2.4.0006.15², не содержали БЭ и не влияли на реакцию лизата амёбоцитов (подтверждено сертификатами). В работе использовали термоблок DB-2A/FDB02AD (Bibby Scientific, Великобритания) и фотокolorиметр BioTek ELx800 (BioTek Instruments, США).

Несмотря на отсутствие регламентации показателя «Бактериальные эндотоксины» и норм содержания БЭ для вакцин данного типа, на основе анализа литературы установлена теоретическая норма предельного содержания БЭ в ЦКВ — менее 200000 ЕЭ/мл [10]. Это значение учитывали при проведении испытаний.

Сравнивали два метода определения БЭ: гель-тромб и кинетический турбидиметрический метод. В гель-тромб методе готовили ряд разведений испытуемых образцов в воде

для БЭТ, добавляли ЛАЛ-реактив (чувствительность 0,25 и 0,03 ЕЭ/мл), инкубировали при температуре 37 °С. В кинетическом турбидиметрическом методе оценивали значения по калибровочной кривой. Критерии приемлемости для калибровочной кривой КСЭ были соблюдены: значения коэффициента корреляции в диапазоне 0,988–1,000 (при норме $\geq 0,980$). Использовали следующий диапазон концентраций КСЭ (для ЛАЛ- и ТАЛ-реактива): 0,1, 1,0, 10, 100 ЕЭ/мл.

Для достижения высокой степени извлечения БЭ из испытуемых образцов рассматривали следующие методы пробоподготовки (на примере серии 33-18): 1) активное перемешивание на вихревой мешалке в течение 15–30 с; 2) нагревание исходных растворов до 80 °С в течение 15 мин; 3) обработка в ультразвуковой бане при температуре 50 °С в течение 15 мин; 4) использование раствора диспергирующего агента Pyrosperser (Lonza, США, кат. № 11620301) в первом разведении (1:10) вместо воды для БЭТ.

Всего было выполнено 46 определений содержания БЭ в образцах ЦКВ. Каждый испытуемый образец исследовали 3–5 раз с интервалом 1–3 мес. В зависимости от продолжительности хранения образцов результаты разделены на 3 группы: группа 1 — определение БЭ в интервале от даты изготовления образца ЦКВ до 1 года хранения (срок годности ЦКВ как полуфабриката до сведения с другими компонентами АКДС-вакцины); группа 2 — определение БЭ в интервале от 1 до 2,5 года после изготовления ЦКВ (период от окончания срока годности полуфабриката до окончания срока годности в составе АКДС-вакцины — 1,5 года); группа 3 — определение БЭ после истечения срока годности АКДС-вакцины (от 2,5 до 6 лет).

Определение специфической безопасности. Специфическую безопасность изготовленных серий ЦКВ определяли в тесте изменения массы тела мышей по методике согласно документу ВОЗ³, подробно изложенной в МУК 4.2.2317-08⁴.

¹ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes; European Parliament and Council; 2010.

European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe; 1986.

ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

Решение ЕЭК от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

Рекомендации Коллегии ЕЭК от 14.11.2023 № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

² ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

³ Recommendations for whole-cell pertussis vaccine, Annex 6, Technical report series No. 941. WHO; 2007.

⁴ МУК 4.2.2317-08 «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракклюшных и бронхисептикозных бактерий». М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009.

Согласно методике, взвешивание проводили до введения препарата, через 72 ч и 7 сут, рассчитывая показатель специфической безопасности как отношение прироста массы тела мышей, которым ввели ЦКВ, к приросту массы тела контрольных животных (требования к величине показателя — не менее 60%). В документе ВОЗ⁵ допускаются изменения в методике на национальном уровне. Так, в Бразилии [12] измерения массы тела мышей проводят не только через 72 ч и 7 сут, но и через 16–24 ч; изменение массы тела через 16–24 ч отражает присутствие в ЦКВ ЛОС, а через 7 сут — наличие необезвреженного коклюшного токсина. В настоящем исследовании взвешивание животных проводили до введения препарата, через 24 ч и 7 сут, выражая изменение массы тела в граммах и процентах.

Проводили рандомизацию мышей по весу и формировали опытную и контрольную группы по 10 животных. Опытным мышам внутрибрюшинно вводили 0,5 мл испытуемого образца (20 млрд/мл инактивированных бактериальных клеток), контрольным — 0,5 мл физиологического раствора, содержащего тиомерсал в той же концентрации как в испытуемых образцах (по регламенту производства коклюшной вакцины № 136-69). Всего проведено 23 испытания по определению показателя специфической безопасности в образцах.

Статистическая обработка данных. Содержание БЭ в испытуемых образцах представлено как среднее арифметическое и его стандартное отклонение. Взаимосвязь между содержанием БЭ в образцах ЦКВ, изменением массы тела мышей и показателем специфической безопасности оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена⁶. Значения коэффициента интерпретировали следующим образом: менее 0,3 — слабая теснота связи; 0,3–0,7 — умеренная теснота связи; 0,7 и более — высокая теснота связи.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение содержания бактериального эндотоксина

Выбор метода определения. Основным количественным измерениям предшествовал выбор метода определения БЭ. Проведено сравнительное испытание двух методов (гель-тромб и турбидиметрический кинетический) с использованием испытуемого образца ЦКВ 33-18. Установлено, что применение

ЛАЛ/ТАЛ-реактивов более высокой чувствительности позволило определять содержание БЭ наиболее корректно (табл. S1 опубликована на сайте журнала в Приложении 1⁷). Результаты испытаний с реактивами чувствительностью 0,03 и 0,1 ЕЭ/мл укладывались в диапазон допустимой погрешности метода.

Для дальнейшей работы выбран турбидиметрический кинетический метод благодаря возможности количественного определения БЭ, тестирования большого количества образцов, а также использованию относительно невысоких разведений испытуемых образцов при построении калибровочной кривой с диапазоном концентраций КСЭ 0,1–100 ЕЭ/мл.

Опытным путем установлено рабочее разведение 1:10000, позволяющее обнаруживать БЭ в образцах.

Пробоподготовка образцов вакцины. Для максимального извлечения БЭ из образцов предварительно подобраны оптимальные условия (табл. S2, Приложение 1). Сравнение различных методов пробоподготовки на примере образца 33-18 показало, что использование ультразвуковой бани нецелесообразно из-за снижения выявления БЭ, а применение диспергирующего агента Pyrospere в первом разведении 1:10, вероятно, способствует извлечению БЭ из бактериальной клетки. Учитывая незначительные различия между результатами, полученными после перемешивания и перемешивания с нагреванием образцов, для рутинных измерений было выбрано только перемешивание.

Таким образом, были установлены оптимальные условия для определения БЭ в испытуемых образцах ЦКВ: турбидиметрический кинетический метод, разведение 1:10000, перемешивание на вихревой мешалке в течение 15–30 с перед отбором аликвоты. Допустимо использование диспергирующего агента.

Определение содержания бактериального эндотоксина в образцах вакцин при различной продолжительности хранения. Содержание БЭ определяли в испытуемых образцах, изготовленных из производственных и циркулирующих штаммов *B. pertussis*, с различной продолжительностью хранения этих образцов (табл. 1). Полученные результаты разделены на 3 группы: группа 1 — данные для двух образцов, изготовленных из циркулирующих штаммов 16-16 и 33-18; группа 2 — данные для образцов, изготовленных из производственного штамма 703 и циркулирующих 1-20 и 2-20;

⁵ Recommendations for whole-cell pertussis vaccine, Annex 6, Technical report series No. 941. WHO; 2007.

⁶ Коэффициент ранговой корреляции Спирмена. <http://www.psychol-ok.ru/statistics/spearman/>

⁷ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-230-240-annex>

Таблица 1. Содержание бактериального эндотоксина (БЭ) в образцах цельноклеточных коклюшных вакцин (ЦКВ), изготовленных из производственных и циркулирующих штаммов, при различной продолжительности хранения вакцин
Table 1. Bacterial endotoxin (BE) content in whole-cell pertussis vaccines (wPV) prepared from production and circulating strains at different storage durations

Штамм <i>B. pertussis</i> Strain <i>B. pertussis</i>	Содержание БЭ при различной продолжительности хранения ЦКВ, ЕЭ/мл Content of BE in wPV at different storage durations, EU/mL
Продолжительность хранения вакцины: до 1 года Vaccine storage duration: up to 1 year	
16-16 (n=3)	41883,3±3687,2
33-18 (n=8)	41872,9±6377,4
Продолжительность хранения вакцины: от 1 до 2,5 года Vaccine storage duration: from 1 to 2.5 years	
703 (n=5)	43980,6±29391,4
1-20 (n=6)	70576,0±22332,9
2-20 (n=6)	46531,7±18412,8
Продолжительность хранения вакцины: от 2,5 до 6 лет Vaccine storage duration: from 2.5 to 6 years	
38 (n=4)	6595,3±1840,6
475 (n=4)	26655,0±8367,7
25-16 (n=4)	2361,8±239,4
28(1)-18 (n=2)	5120,5±379,4
30-18 (n=4)	1353,8±286,5

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

группа 3 – данные для образцов, изготовленных из производственных штаммов 38 и 475 и циркулирующих штаммов 25-16, 28(1)-18, 30-18.

Показано, что в группах 1 и 2 средние значения содержания ЛОС в образцах ЦКВ 16-16, 33-18, 703 и 2-20 практически одинаковы: уровень ЛОС в ЦКВ из циркулирующих штаммов соответствует таковому в производственном штамме 703. Исключение составила вакцина, изготовленная из циркулирующего штамма 1-20, с несколько более высоким содержанием БЭ. В группе 3 зафиксировано значительное снижение содержания БЭ в испытуемых образцах. При этом вакцина из производственного штамма 475 сохранила уровень эндотоксина, близкий к значениям в первых двух группах, тогда как образцы из производственного штамма 38 и циркулирующих штаммов 25-16, 28(1)-18 и 30-18 содержали значительно меньше БЭ.

Определение содержания бактериального эндотоксина, изменения массы тела мышей и показателя специфической безопасности для образцов вакцин

Данные о содержании БЭ в испытуемых образцах ЦКВ и изменении массы тела мышей

после внутрибрюшинного введения этих же вакцин представлены в таблице 2. Также приведены данные определения показателя специфической безопасности для тех опытов, которые выполнены одновременно с оценкой БЭ или с интервалом не более недели. БЭ определяли *in vitro*, специфическую безопасность – *in vivo* с использованием тех же образцов. Таким образом, каждому измерению БЭ в ЦКВ соответствовал опыт на мышах с введением той же серии вакцины, в котором определяли изменение массы тела (г, %) через 24 ч и 7 сут, а также показатель специфической безопасности.

Показатели специфической безопасности в экспериментальных сериях ЦКВ (за исключением образцов 16-16 и 33-18) значительно превышали 60%, что свидетельствует об их соответствии требованиям ВОЗ⁸ и МУК 4.2.2317-08⁹. Значения показателя специфической безопасности в образцах 16-16 и 33-18 были ниже 60%, что, вероятно, связано с использованием недавно изготовленных образцов, в которых процесс детоксикации еще не завершился.

Прирост массы тела мышей на 7 сут после введения препарата соответствовал значениям,

⁸ Recommendations for whole-cell pertussis vaccine, Annex 6, Technical report series No. 941. WHO; 2007.

⁹ МУК 4.2.2317-08 «Отбор, проверка и хранение производственных штаммов коклюшных, паракоклюшных и бронхисептикозных бактерий». М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009.

Таблица 2. Содержание бактериального эндотоксина (БЭ) в образцах цельноклеточных коклюшных вакцин (ЦКВ), изменение массы тела мышей после введения вакцин и показатель специфической безопасности

Table 2. Bacterial endotoxin (BE) content in samples of whole-cell pertussis vaccines (wPV), body weight change in mice after their administration, and specific safety index

Штамм <i>B. pertussis</i> для изготовления ЦКВ <i>Strain of B. pertussis used for wPV manufacturing</i>	Содержание БЭ, ЕД/мл <i>BE content, EU/mL</i>	Изменение массы тела мышей, г / % <i>Change in body weight of mice, g / %</i>		Показатель специфической безопасности, % <i>Specific safety index, %</i>
		На 1 сут <i>On Day 1</i>	На 7 сут <i>On Day 7</i>	
38	8163	0,21/1,43	8,0/54,30	109,3
	3893	0,46/3,1	9,22/62,20	111,1
475	21170	0,43/2,92	6,74/45,73	103,9
703	38100	0,11/0,73	6,34/41,82	85,2
	36430	-0,18/-1,18	5,97/39,59	99,6
	94270	-0,77/-5,19	5,77/38,91	94,4
16-16	29150	-1,52/-9,91	1,16/7,56	15,8
	48540	-0,66/-4,25	1,83/12,11	28,1
	47960	-0,79/-5,37	3,27/22,35	51,45
25-16	2486	-0,11/-0,74	8,90/59,97	119,6
	2015	-0,16/-1,06	6,0/39,58	112,4
28(1)-18	4584	0,09/0,62	6,84/46,79	105,4
33-18	29820	-0,60/-3,96	3,72/24,57	50,0
	37780	0,21/1,37	3,49/22,84	55,0
	25040	-0,93/-6,24	2,62/17,57	42,9
1-20	67480	-0,95/-6,15	6,35/41,10	75,3
	38420	-0,19/-1,26	8,17/54,0	109,8
	35480	-1,17/-7,72	5,20/33,74	97,4
2-20	29810	-0,20/-1,36	7,66/52,07	103,0
	23420	-0,25/-1,64	5,26/34,54	98,5
	27700	-0,02/-0,14	7,38/50,0	113,7
30-18	<1000	0,10/0,68	8,20/55,30	102,5
	<1270	-0,37/-2,43	7,07/46,50	96,6

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

получаемым при оценке качества коммерческих вакцин надлежащего качества. Изменение массы тела мышей через 24 ч ранее при экспертизе коммерческих серий АКДС-вакцины не оценивали, поэтому для объективного анализа полученных результатов требуются дальнейшие наблюдения.

Для оценки влияния ЛОС в образцах на параметры специфической безопасности проведен корреляционный анализ, который выявил статистически значимые обратные корреляции умеренной силы между содержанием БЭ в исследуемых сериях вакцин и всеми параметрами

специфической безопасности (табл. 3). На 7 сут связь с изменением массы тела ($r_s \approx -0,50$, $p < 0,05$) была несколько сильнее, чем на 1 сут ($r_s \approx -0,45$, $p < 0,05$). Наиболее сильная обратная корреляция наблюдалась между содержанием БЭ и показателем специфической безопасности ($r_s = -0,535$, $p < 0,01$). Полученные данные свидетельствуют о том, что ЛОС, входящий в состав клеток *B. pertussis*, вносит прямой вклад в токсическое действие, регистрируемое при оценке специфической безопасности ЦКВ, и значимость его уровня как фактора, определяющего тяжесть реакции организма на введение вакцины.

Таблица 3. Корреляция между содержанием бактериального эндотоксина (БЭ) и параметрами специфической безопасности у мышей (изменение массы тела и показатель специфической безопасности)

Table 3. Correlation between bacterial endotoxin (BE) content and specific safety parameters in mice (body weight change and specific safety index)

Параметр <i>Parameter</i>	Коэффициент ранговой корреляции Спирмена, r_s <i>Spearman's rank correlation coefficient, r_s</i>
Изменение массы тела через 24 ч: <i>Body weight change after 24 hours:</i> граммы / <i>grams</i> %	–0,451* –0,445*
Изменение массы тела через 7 сут: <i>Body weight change after 7 days:</i> граммы / <i>grams</i> %	–0,502* –0,501*
Показатель специфической безопасности, % <i>Specific safety index, %</i>	–0,535**

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

Примечание. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Note. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

ОБСУЖДЕНИЕ

При сопоставлении наших результатов с литературными данными установлено, что содержание БЭ в исследованных образцах ЦКВ в целом укладывается в диапазон, характерный для зарубежных коммерческих АКДС-вакцин с цельноклеточным коклюшным компонентом (7600–181640 ЕЭ/мл) [10]. Так, содержание БЭ в образце ЦКВ из производственного штамма 703 при хранении 1–2,5 года составило $43980,6 \pm 29391,4$ ЕЭ/мл; уровень БЭ для образцов ЦКВ из циркулирующих штаммов (16-16, 33-18, 1-20, 2-20) в тот же период также находился в указанном диапазоне (табл. 1). Значительный разброс значений БЭ как в нашем исследовании, так и в случае коммерческих вакцин, по-видимому, обусловлен использованием различных штаммов *B. pertussis*, технологических подходов производства и количеством бактериальных клеток в дозе вакцины. Следует отметить, что приведенные диапазоны БЭ отражают результаты многолетнего анализа вакцин. Рекомендованный уровень БЭ для вакцинных препаратов, содержащих анатоксины, составляет менее 200000 ЕЭ/мл, что обусловлено сложным составом таких вакцин и их получением из бактериальных клеток с минимальной степенью очистки. Для сравнения, в БКВ, состоящих из стандартизованного набора отдельных антигенов, уровень БЭ составляет 0,288–1390,8 ЕЭ/мл [10].

В исследованных образцах ЦКВ, находившихся на хранении более 2,5 года, за исключением штаммов 475 и 38, выявлен значительно более низкий уровень БЭ. Возможно, это связано с длительным хранением, которое могло повлиять на структурную целостность антигенов.

Несмотря на различия в уровнях БЭ в образцах ЦКВ, его выявленное содержание не оказывало значимого влияния на специфическую безопасность вакцин. Как следует из таблицы 2, показатель специфической безопасности для всех исследованных образцов, кроме свежееизготовленных 16-16 и 33-18, превышал 60%. В этих двух образцах процесс детоксикации, по-видимому, еще не завершился, чем и объясняются значения ниже нормы (<60%). Важно отметить, что содержание БЭ в образцах 16-16 и 33-18 было сопоставимо с его уровнем в образцах со сроком хранения 1–2,5 года, имевших нормальный показатель безопасности (>60%). Это позволяет предположить, что низкие значения показателя безопасности обусловлены не присутствием ЛОС, а действием других токсинов, в частности коклюшного токсина. Кроме того, бактериальная клетка *B. pertussis* содержит около 3000 различных белков, которые также могут вносить вклад в реактогенность препарата [13].

Учитывая, что ЛОС является одним из факторов, влияющих на реактогенность, в настоящем исследовании оценена корреляция между параметрами специфической безопасности и содержанием данного токсина в образце ЦКВ. Полученные данные (табл. 3) свидетельствуют о том, что ЛОС вносит прямой вклад в токсическое действие, регистрируемое при оценке параметров специфической безопасности ЦКВ, и его уровень является значимым фактором, определяющим тяжесть реакции организма мышей на введение вакцины.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено содержание ЛОС в составе производственных и циркулирующих штаммов *B. pertussis* и показана его корреляционная связь со специфической безопасностью. Высокие

значения показателя специфической безопасности образцов ЦКВ отражают их незначительную реактогенность, то есть присутствующее количество ЛОС не оказывает значимого влияния на безопасность. Данное исследование выполнено на экспериментальных сериях ЦКВ, изготовленных из отдельных штаммов. В дальнейшем планируется определить содержание ЛОС в коммерческих сериях АКДС-вакцины.

Согласно данным литературы ЛОС считается одним из основных компонентов, ответственных за реактогенность ЦКВ [12, 14, 15]. Действуя как изолированно, так и синергично с другими токсинами *B. pertussis* (коклюшный токсин, аденилатциклаза), ЛОС может вызывать серьезные нежелательные явления у реципиентов АКДС-вакцины [13]. Эндотоксический эффект ЛОС препятствует его включению в состав БКВ [16]. Реактогенность вакцин, проявляющаяся нежелательными явлениями, приводит к утрате доверия у населения к вакцинации, что может иметь долгосрочные негативные последствия. Поэтому продолжается поиск путей создания высококачественных вакцин. Идеальная вакцина должна быть не реактогенной, простой в применении и высокоиммуногенной, обеспечивая длительный иммунитет [13].

Один из подходов к снижению реактогенности — снижение содержания ЛОС в вакцине. Имеются данные о том, что химическая экстракция ЛОС приводит к значительному снижению его уровня (до 20%) и уменьшению токсичности без влияния на эффективность и стабильность АКДС-вакцины [12]. Эндотоксическая активность в такой вакцине составляла $1,54 \times 10^4$ против $0,53 \times 10^6$ МЕ/мг в коммерческом препарате [12].

В последние десятилетия для снижения эндотоксичности ЦКВ активно применяются методы генной инженерии [14, 17–21]. Так, экспрессия генетически модифицированного фермента PagP *B. pertussis* приводила к повышению эндотоксической активности ЛОС, а фермента PagL — к снижению активности ЛОС [17]. ЛОС из штаммов, экспрессирующих PagP, обладал более высокой способностью стимулировать продукцию IL-6 макрофагами, тогда как клетки с PagL продуцировали на 21% меньше ЛОС и проявляли сниженную стимулирующую активность по сравнению с контрольным штаммом [17].

Помимо эндотоксичности, ЛОС обладает мощной адъювантной активностью, что делает его важным компонентом ЦКВ [17]. ЛОС является наиболее широко представленной структурой на клеточной поверхности *B. pertussis*, играющей важную роль во взаимодействиях хозяина

и патогена [22]. Действуя синергически с трахеальным цитотоксином и коклюшным токсином, ЛОС участвует в индукции синтазы оксида азота в эпителиальных клетках дыхательных путей с последующей выработкой активных форм кислорода, таких как окись азота (NO), и повреждением реснитчатых клеток слизистой оболочки дыхательных путей [23, 24].

Кроме участия в патогенезе, ЛОС проявляет свойства защитного антигена [25]. Антитела к ЛОС обладают комплемент-зависимой бактерицидной активностью [26, 27] и существенно снижают колонизацию дыхательных путей мышей после аэрозольной инфекции [28]. Олигосахаридный сегмент ЛОС, не обладающий активностью эндотоксина, содержит эпитопы для бактерицидных антител [26, 29, 30], что делает его перспективным антигеном для включения в состав БКВ. Однако олигосахариды неиммуногенны, поэтому для преодоления этого проводят их конъюгирование с иммуногенным носителем, синтезируя гликоконъюгаты [16, 27, 31]. В случае *B. pertussis* важно, что олигосахаридный компонент эволюционно стабилен и практически неизменен у клинических изолятов на протяжении многих лет [31], то есть не подвержен антигенному дрейфу [16]. Липидная часть ЛОС также консервативна, что указывает на ее жизненную важность для бактерии. ЛОС активирует клетки врожденного иммунитета, способствуя активации адаптивного ответа и индукции выработки бактерицидных антител [31, 32]. Это позволяет рассматривать ЛОС как необходимый компонент коклюшных вакцин.

В настоящее время не определено минимальное количество ЛОС, обеспечивающее защитную активность, безопасность и стабильность вакцины. Учитывая пирогенность и токсичность эндотоксинов, актуальны дальнейшие исследования по оценке их содержания как в исходном материале, так и в полуфабрикатах и готовых коклюшных вакцинах.

ВЫВОДЫ

1. Определено содержание ЛОС в ЦКВ, изготовленных из трех производственных и семи циркулирующих штаммов *B. pertussis*. Содержание ЛОС в ЦКВ из производственного штамма 703 ($43980,6 \pm 29391,4$ ЕЭ/мл) статистически не отличалось от такового в ЦКВ из циркулирующих штаммов. В образцах из циркулирующих штаммов (16-16, 33-18, 1-20, 2-20, 25-16, 28(1)-18, 30-18), исследованных в течение 2,5 лет после изготовления, содержание ЛОС составляло от $41872,9 \pm 6377,4$ до $70576,0 \pm 22332,9$ ЕЭ/мл. В вакцинах 38, 25-16, 28(1)-18, 30-18, хранившихся

- от 2,5 до 6 лет после изготовления, уровень ЛОС (за исключением одной вакцины) составлял от 1353,8±286,5 до 6595,3±1840,6 ЕЭ/мл.
- При определении специфической безопасности исследуемых вакцин выявлена обратная корреляционная связь между содержанием ЛОС в вакцине и изменением массы тела мышей через 24 ч и 7 сут, а также показателем специфической безопасности.
 - Полученные данные обосновывают актуальность дальнейших исследований для изучения содержания ЛОС в ЦКВ из производственных и циркулирующих штаммов, а также роли ЛОС в формировании реактогенности вакцин и определения его минимального количества, обеспечивающего требования по защитной активности, специфической безопасности и стабильности препарата.

Литература/References

- Gendrel D, Raymond J. Pertussis worldwide. Vaccinating children and adults. *Med Trop Sante Int.* 2023;3(4): mtsi.v3i4.2023.446 (In French). <https://doi.org/10.48327/mtsi.v3i4.2023.446>
- Liu Y, Yu D, Wang K, Ye Q. Global resurgence of pertussis: A perspective from China. *J Infect.* 2024;89(5):106289. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2024.106289>
- Winter K, Harriman K, Murray E, et al. Risk factors associated with infant death from pertussis: A case-control study. *Clin Infect Dis.* 2015;61(7):1099–106. <https://doi.org/10.1093/cid/civ472>
- Guzman-Holst A, Luna-Casas G, Cervantes-Apolinar MY, et al. Pertussis infant morbidity and mortality trends after universal maternal immunisation in Mexico: An ecological database study with time-series analysis. *Vaccine.* 2021;39(16):2311–18. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.02.038>
- Macina D, Evans KE. *Bordetella pertussis* in school-age children, adolescent and adults: A systematic review of epidemiology and mortality in Europe. *Infect Dis Ther.* 2021;10(4):2071–118. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00520-9>
- Decker MD, Edwards KM. Pertussis (whooping cough). *J Infect Dis.* 2021;224(12 Suppl 2):S310–S320. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa469>
- Ayme G, Caroff M, Chaby R, et al. Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. *Infect Immun.* 1980;27(3): 739–45. <https://doi.org/10.1128/iai.27.3.739-745.1980>
- Watanabe M, Takimoto H, Kumazawa Y, Amano K. Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J Gen Microbiol.* 1990;136(3):489–93. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-3-489>
- Алексеева ИА, Перельгина ОВ, Колышкина ЕД. Коклюшная вакцина и роль липоолигосахарида *Bordetella pertussis* в иммунном ответе на коклюшную инфекцию и вакцинацию. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(1):10–9. Alekseeva IA, Perelygina OV, Kolyshkina ED. Pertussis vaccines and the role of *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide in the immune response to pertussis infection and vaccination. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2021;21(1):10–9. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-1-10-19>
- Brito LA, Singh M. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. *J Pharm Sci.* 2011;100(1):34–7. <https://doi.org/10.1002/jps.22267>
- Nazirov MR, Poddubikov AV, Kukes VG, et al. Quantitative assay of *B. pertussis* lipopolysaccharide. *Bull Exp Biol Med.* 2022; 172(6):718–20. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05463-w>
- Dias WO, van der Ark AAJ, Sakauchi MA, et al. An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(2):339–48. <https://doi.org/10.4161/hv.22847>
- Moylett EH, Hanson IC. Mechanistic actions of the risks and adverse events associated with vaccine administration. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(5):1010–20. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.09.007>
- Pérez-Ortega J, van Boxtel R, de Jonge EF, Tommassen J. Regulated expression of *lpxC* allows for reduction of endotoxicity in *Bordetella pertussis*. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14):8027. <https://doi.org/10.3390/ijms23148027>
- Baffeta F, Cecchi R, Guerrini E, et al. Relationship between endotoxin content in vaccine preclinical formulations and animal welfare: An extensive study on historical data to set an informed threshold. *Vaccines* 2024;12(7):815. <https://doi.org/10.3390/vaccines12070815>
- Koj S, Ucieklak K, Lugowski C, Niedziela T. Structure and immunogenicity of the *Bordetella pertussis* LOS-derived oligosaccharides in the endosomal-like pre-processing mice model. *Vaccines (Basel).* 2021;9(6):645. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060645>
- Geurtsen J, Steeghs L, Hamstra HJ, et al. Expression of the lipopolysaccharide-modifying enzymes PagP and PagL modulates the endotoxic activity of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 2006;74(10):5574–85. <https://doi.org/10.1128/IAI.00834-06>
- Arenas J, Pupo E, Phielix C, et al. Shortening the lipid A acyl chains of *Bordetella pertussis* enables depletion of lipopolysaccharide endotoxic activity. *Vaccines (Basel).* 2020;8(4):594. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040594>
- Pérez-Ortega J, van Boxtel R, Plisnier M, et al. Biosynthesis of the inner core of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: Effect of mutations on LPS structure, cell division, and Toll-like receptor 4 activation. *Int J Mol Sci.* 2023;24(24):17313. <https://doi.org/10.3390/ijms242417313>
- Skopova K, Holubova J, Bockova B, et al. Less reactogenic whole-cell pertussis vaccine confers protection from *Bordetella pertussis* infection. *mSphere.* 2025;10(4):e0063924. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00639-24>
- Mohamed YF, Fernandez RC. Programming *Bordetella pertussis* lipid A to promote adjuvanticity. *Microbial Cell Factories.* 2024;23(1):250. <https://doi.org/10.1128/s12934-024-02518-7>
- de Gouw D, Diavatopoulos DA, Bootsma HJ, et al. Pertussis: A matter of immune modulation. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(3):441–74. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00257.x>
- Flak TA, Goldman WE. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol.* 1999;1(1):51–60. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00004.x>
- Flak TA, Heiss LN, Engle JT, Goldman WE. Synergistic epithelial responses to endotoxin and a naturally occurring muramyl peptide. *Infect Immun.* 2000;68(3):1235–42. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1235-1242.2000>
- Trollfors B, Lagergård T, Taranger J, et al. Serum immunoglobulin G antibody responses to *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide and *B. parapertussis* lipopolysaccharide in children with pertussis and parapertussis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(5):1015–17. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.5.1015-1017.2001>
- Belcher T, Dubois V, Rivera-Millot A, et al. Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. *Virulence.* 2021;12(1):2608–32. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1980987>

27. Gao J, Huang L, Luo S, et al. A novel vaccine formulation candidate based on lipooligosaccharides and pertussis toxin against *Bordetella pertussis*. *Front Immunol*. 2023; 14:1124695. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1124695>
28. Mountzourou KT, Kimura A, Cowell JL. A bactericidal monoclonal antibody specific for the lipooligosaccharide of *Bordetella pertussis* reduces colonization of the respiratory tract of mice after aerosol infection with *B. pertussis*. *Infect Immun*. 1992;60(12):5316–8. <https://doi.org/10.1128/iai.60.12.5316-5318.1992>
29. Weiss AA, Patton AK, Millen SH, et al. Acellular pertussis vaccines and complement killing of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 2004;72(12):7346–51. <https://doi.org/10.1128/iai.72.12.7346-7351.2004>
30. Wang P, Ramadan S, Dubey P, et al. Development of carbohydrate based next-generation anti-pertussis vaccines. *Bioorg Med Chem*. 2022;15(74):117066. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2022.117066>
31. Albitar-Nehme S, Basheer SM, Njamkepo E, et al. Comparison of lipopolysaccharide structures of *Bordetella pertussis* clinical isolates from pre- and post-vaccine era. *Carbohydr Res*. 2013;378:56–62. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.05.002>
32. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: Translating innate to adaptive immunity. In: Pulendran B, Ahmed R, eds. *From innate immunity to immunological memory. Current topics in microbiology and immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2006. P. 17–58. https://doi.org/10.1007/3-540-32636-7_2

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликовано Приложение 1.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-230-240-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **И.А. Алексеева** — формулирование цели работы, анализ и систематизация данных научной литературы, анализ и интерпретация результатов исследования, написание и редактирование текста рукописи; **О.В. Шаповалова** — проведение экспериментов, анализ и интерпретация результатов исследования; редактирование текста рукописи; **Н.П. Неугодова** — планирование исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование текста рукописи; **Д.Н. Лепихова** — проведение экспериментов, сбор и анализ данных научной литературы, редактирование текста рукописи; **Г.А. Сапожникова** и **И.В. Ибрагимхалилова** — проведение экспериментов, сбор и анализ данных научной литературы, работа с иллюстративным материалом.

Соответствие принципам этики. Проведение исследования было одобрено на заседании локального этического комитета ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (протокол заседания № 14 от 20.10.2025).

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

Supplementary information. Supplementary material 1 is available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-2-230-240-annex>

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **I.A. Alekseeva** conceptualized the study, analyzed and systematized the scientific literature data, analyzed and interpreted the data, and drafted and edited the manuscript. **O.V. Shapovalova** conducted experiments, analyzed and interpreted the data, and edited the manuscript. **N.P. Neugodova** designed the study, analyzed and interpreted the data, and edited the manuscript. **D.N. Lepikhova** conducted experiments, collected and analyzed the scientific literature data, and edited the manuscript. **G.A. Sapozhnikova** and **I.V. Ibragimkhalilova** conducted experiments, collected and analyzed the scientific literature data, and prepared the graphical materials.

Ethics approval. The study was approved by the Local Ethics Committee at the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (meeting minutes No. 14 dated October 20, 2025).

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

Об авторах / Authors

Алексеева Ирина Андреевна, д-р мед. наук / Irina A. Alekseeva, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5586-2933>

Шаповалова Ольга Владимировна, канд. фарм. наук / Olga V. Shapovalova, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0305-7769>

Сапожникова Галина Алексеевна / Galina A. Sapozhnikova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0379-5980>

Неугодова Наталия Петровна, канд. биол. наук / Nataliia P. Neugodova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

Лепихова Дарья Николаевна / Darya N. Lepikhova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-4061-8892>

Ибрагимхалилова Ильхамья Вейсоловна, канд. биол. наук / Ilkhamya V. Ibragimkhalilova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-8002-2407>

Поступила 03.10.2025

После доработки 27.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Received October 3, 2025

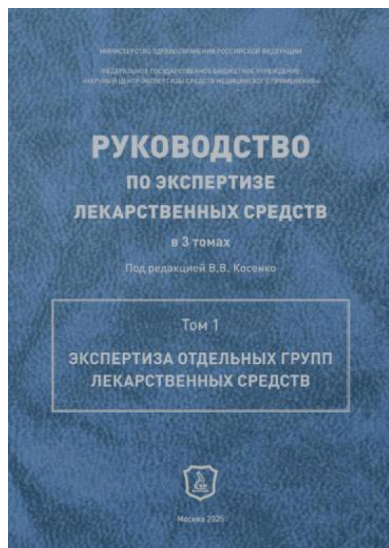
Revised February 27, 2026

Accepted March 13, 2026



2025

РУКОВОДСТВО по экспертизе лекарственных средств в 3 томах



Руководство подготовлено на основе национального законодательства в сфере обращения лекарственных средств, нормативных правовых актов Евразийского экономического союза и правил Европейского агентства по лекарственным средствам.



Том 1. Экспертиза отдельных групп лекарственных средств

Том 2. Экспертиза биологических лекарственных препаратов

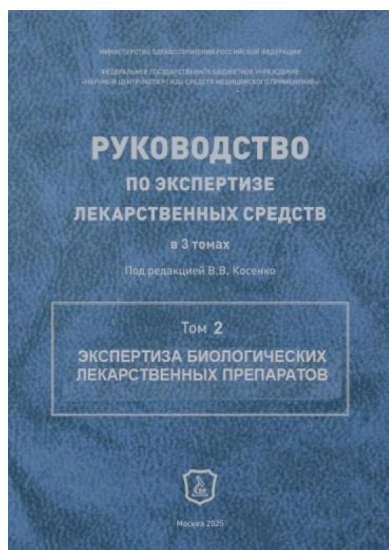
Том 3. Экспертиза качества и безопасность лекарственных средств



Адресовано исследователям, занимающимся разработкой новых лекарственных препаратов, а также специалистам, осуществляющим экспертизу регистрационных досье.



Включение данного руководства в нормативную базу ЕАЭС создаст предпосылки для вывода российских препаратов на европейский рынок.



Подробнее
о приобретении
изданий на сайте
www.regmed.ru
(вкладка «Издания»)



Экспертиза качества и безопасности
лекарственных средств

Доклинические и клинические исследования

Разработка лекарственных препаратов





ISSN 2221-996X



9 772221 996004