

УДК 615.099



Оценка алергизирующих и иммунотоксичных свойств рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы в доклинических и клинических исследованиях

С.С. Маркин^{1,2}, С.В. Иванов^{1,2}, И.П. Белецкий³, М.В. Захарова⁴,
Э.А. Пономарев^{5,6}, Е.В. Арзамасцев⁷

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Россия, 119435, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10 стр. 8

² Общество с ограниченной ответственностью «СупраГен», Россия, 119270, г. Москва, Лужнецкая наб., д. 6 стр. 1

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Россия, 142290, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, Россия, 142290, г. Пущино, пр. Науки, д. 5

⁵ Государственное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 25», Россия, 400138, г. Волгоград, ул. им. Землячки, д. 74

⁶ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400066, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

⁷ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 121552, г. Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а

E-mail: phospholipovit@ibmc.msk.ru

Получена 05.01.2024

После рецензирования 28.11.2024

Принята к печати 06.03.2025

Цель. Изучить возможные алергизирующие и иммунотоксичные свойства молекулы рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы с заменой аминокислот Lys₇₄, Glu₇₅ и Arg₇₇ на аланин в доклинических и клинических исследованиях.

Материалы и методы. Исследование алергизирующих и иммунотоксичных свойств препарата рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы проведено по стандартным методикам в соответствии с требованиями Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ на морских свинках ($n=15$) и мышах ($n=45$) в дозах, в 5, 10 и 20 раз превышающих терапевтические (для человека). Клиническое исследование проведено у 100 пациентов с острым инфарктом миокарда с подъёмом сегмента ST после однократного внутривенного введения препарата. Исследование включало определение титров специфических антител к рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназе и оценку нейтрализующей активности плазмы.

Результаты. При проведении полного комплекса доклинических исследований было установлено, что препарат не влияет на клеточный и гуморальный иммунный ответ у морских свинок и мышей в дозах, кратно превышающих терапевтические для человека. Установлено, что препарат не вызывал реакцию гиперчувствительности немедленного типа (индекс по Weigle 0) и замедленного типа (0 баллов по С.В. Суворову) у морских свинок, а также не влиял на клеточность подколенных лимфоузлов (индекс реакции 0,91) и число ядродержащих и антителообразующих клеток в селезёнке мышей. В результате клинического исследования рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы алергических реакций не зарегистрировано. Оценка нейтрализующей активности плазмы крови пациентов, которым вводилась рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа, показало, что пробы

Для цитирования: С.С. Маркин, С.В. Иванов, И.П. Белецкий, М.В. Захарова, Э.А. Пономарев, Е.В. Арзамасцев. Оценка алергизирующих и иммунотоксичных свойств рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы в доклинических и клинических исследованиях. *Фармация и фармакология*. 2025;13(1):31-44. DOI: 10.19163/2307-9266-2025-13-1-31-44

© С.С. Маркин, С.В. Иванов, И.П. Белецкий, М.В. Захарова, Э.А. Пономарев, Е.В. Арзамасцев, 2025

For citation: S.S. Markin, S.V. Ivanov, I.P. Beletsky, M.V. Zakharova, E.A. Ponomarev, E.V. Arzamascev. Assessment of the allergenic and immunotoxic properties of the recombinant non-immunogenic staphylokinase in preclinical and clinical trials. *Pharmacy & Pharmacology*. 2025;13(1):31-44. DOI: 10.19163/2307-9266-2025-13-1-31-44

70% пациентов не обладают нейтрализующей активностью: 30% проб пациентов характеризовались минимальной нейтрализующей активностью $0,33 \pm 0,02$ мкг/мл, что в 30–310 раз ниже, чем после применения нативной стафилокиназы. Эти значения в 7,8 раз ниже определяемой концентрации рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы в крови (2,59 мкг/мл). Таким образом, препарат не приводит к образованию антител, способных нейтрализовать его действие при повторном введении.

Заключение. По результатам проведённых исследований доказано отсутствие алергизирующих и иммунотоксичных свойств рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы и ее безопасность в отношении иммунной системы.

Ключевые слова: тромболитис; рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа; алергические реакции; исследования иммунотоксичности

Список сокращений: АОК — антителообразующие клетки; ИЛ — интерлейкин; ОИМнСТ — острый инфаркт миокарда с подъёмом сегмента ST; ТЭЛА — тромбоэмболия легочной артерии; ЭБ — эритроциты барана.

Assessment of the allergenic and immunotoxic properties of the recombinant non-immunogenic staphylokinase in preclinical and clinical trials

S.S. Markin^{1,2}, S.V. Ivanov^{1,2}, I.P. Beletsky³, M.V. Zakharova⁴,
E.A. Ponomarev^{5,6}, E.V. Arzamashev⁷

¹ Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya Str., bldg 8, Moscow, Russia, 119435

² SuperGene,

6 Luzhnetskaya Emb., bldg 1, Moscow, Russia, 119270

³ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences,

3 Institutskaya Str., Pushino, Russia, 142290

⁴ Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,

5 Nauki Ave., Pushino, Russia, 142290

⁵ City Clinical Hospital of Emergency Medicine No. 25,

74 Zemlyachki Str., Volgograd, Russia, 400138

⁶ Volgograd State Medical University,

1, Pavshikh Bortcov Sq., Volgograd, Russia, 400066

⁷ National Medical Research Center of Cardiology named after Academician E.I. Chazov,

15a Academician Chazov Str., Moscow, Russia, 121552

E-mail: phospholipovit@ibmc.msk.ru

Received 05 Jan 2024

After peer review 28 Nov 2024

Accepted 06 March 2025

The aim. To study possible allergenic and immunotoxic properties of the recombinant non-immunogenic staphylokinase molecule with the amino acids replacement Lys₇₄, Glu₇₅ and Arg₇₇ with alanine in preclinical and clinical studies.

Materials and methods. The allergenic and immunotoxic properties of the recombinant non-immunogenic staphylokinase drug were studied using standard methods in accordance with the Guidelines for the Preclinical Study of New Substances in guinea pigs ($n=15$) and mice ($n=45$) at doses 5, 10 and 20 times higher than therapeutic (for humans). A clinical study was conducted in 100 patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction after a single intravenous injection of the drug. The study included the determination of titers of specific antibodies to recombinant non-immunogenic staphylokinase and the study of plasma neutralizing activity.

Results. During the complete set of preclinical studies, it was found that the drug does not affect the cellular and humoral immune response in guinea pigs and mice at doses many times higher than therapeutic doses for humans. It was found that the drug did not cause an immediate-type of hypersensitivity reaction (Weigle index 0) and a delayed type IV (0 points according to S.V. Suvorov) in guinea pigs, did not affect the cellular capacity of popliteal lymph nodes (reaction index 0.91), did not affect the number of nucleated and antibody-forming cells in the spleen of mice. As a result of a clinical study of recombinant non-immunogenic staphylokinase, no allergic reactions were registered. Assessment of the neutralizing activity of the plasma of patients who were administered recombinant non-immunogenic staphylokinase showed that 70% samples did not have neutralizing activity: 30% of the patients' samples were characterized by a minimum neutralizing activity of 0.33 ± 0.02 µg/mL, which is 30–310 times lower than after the use of native staphylokinase. These values are 7.8 times lower than the determined concentration of recombinant non-immunogenic staphylokinase in the blood (2.59 µg/mL). Thus, the drug does not lead to the anti-staphylokinase neutralizing antibodies formation capable to neutralize its effect upon repeated administration.

Conclusion. According to the results of the trials, the absence of allergenic and immunotoxic properties of the recombinant non-immunogenic staphylokinase and its safety in relation to the immune system have been proven.

Keywords: thrombolysis; recombinant non-immunogenic staphylokinase; allergy; immunotoxic studies

Abbreviations: AFC — antibody-forming cells; IL — interleukin; STEMI — acute ST-segment elevation myocardial infarction; PE — pulmonary embolism; RE — ram erythrocytes.

ВВЕДЕНИЕ

Инфаркт миокарда, ишемический инсульт и тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) продолжают оставаться лидирующими причинами смертности среди всех сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Распространённость инфаркта миокарда (на 100 тыс. человек) достигает 500 случаев у мужчин и 100 случаев у женщин, ишемического инсульта — 460–560 случаев, ТЭЛА — 35–40 случаев [1]. Тромболитическая терапия — патогенетически обоснованный метод лечения острого инфаркта миокарда с подъёмом сегмента ST (ОИМпST), ишемического инсульта, а также массивной ТЭЛА, основанный на растворении фибринового сгустка (тромба) и восстановления кровотока в окклюзивном сосуде. Проведение тромболитической терапии позволяет снизить риск инвалидности и смертность [1].

Тромболитическая терапия осуществляется с использованием препаратов на основе рекомбинантных белков, что определяет необходимость оценки их потенциального влияния на иммунную систему. Стафилокиназа является уникальным тромболитическим веществом с высокой биологической активностью и фибринолитическими свойствами [2]. Являясь активатором плазминогена, стафилокиназа вначале реагирует с минимальным содержанием плазмينا (3 ррт), находящимся на фибриновом сгустке, с последующей активацией γ -плазминогена и образованием тройного комплекса «стафилокиназа–плазмин–плазминоген», который лизирует фибриновые сгустки. Одновременно образующийся плазмин усиливает фибринолитическую активность стафилокиназы, а его избыток быстро инактивируется α_2 -антиплазмином. При ингибировании комплекса «плазмин–стафилокиназа» α_2 -антиплазмином высвобождается активная молекула стафилокиназы для последующих рециклов. Рециркуляция стафилокиназы позволяет снизить применяемую в клинической практике дозу по сравнению с тканевыми активаторами плазминогена, и делает ее независимой от массы тела пациента [3].

Ингибирование комплекса «плазмин–стафилокиназа» в плазме происходит более чем в 100 раз быстрее в сравнении с тем же процессом в тромбе. Таким образом, стафилокиназа обладает высокой селективностью к фибрину, что предотвращает образование плазмينا из плазминогена в системном кровотоке [4]. Благодаря высокой фибринселективности препарата, применение стафилокиназы характеризуется минимальным риском развития геморрагических осложнений.

В результате кинетического анализа взаимодействия стафилокиназы с плазмином было установлено, что каталитическая активность

стафилокиназы в 1000 раз выше, чем у алтеплазы [5]. Высокая фибринселективность стафилокиназы сделала ее препаратом первого ряда для лечения ОИМпST и ишемического инсульта еще в конце прошлого столетия. Однако наличие иммуногенных свойств нативной молекулы стафилокиназы препятствовало ее внедрению в клиническую практику. Для создания неиммуногенной стафилокиназы была произведена замена аминокислот Lys₇₄, Glu₇₅ и Arg₇₇ на аланин в искомой молекуле. Рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа представляет собой одноцепочечную молекулу, состоящую из 138 аминокислот, с молекулярной массой 15,5 кДа. Установлено, что фибринолитическая активность рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на 40% выше, чем у молекулы нативной стафилокиназы [6].

ЦЕЛЮ данной работы было изучение аллергизирующих и иммунотоксичных свойств молекулы рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы в процессе доклинических и клинических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Доклинические исследования

Исследование аллергизирующих, иммунотоксических и иммуногенных свойств препарата рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы проведено в соответствии с требованиями Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2005) в лаборатории лекарственной токсикологии ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России под руководством проф. Е.В. Арзамасцева в период с сентября 2008 по январь 2010 года. Проведение исследований одобрено Этическим комитетом федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 1 от 04.09.2008 г.)

Исследование влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на реакцию гиперчувствительности немедленного типа у морских свинок

Исследования выполнены на 15 пёстрых самцах морских свинок со средней массой тела 290 ± 20 г, полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая» (ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России). Животные содержались в стандартных условиях вивария в вентилируемых клетках с 12-часовым режимом светового дня, при температуре воздуха $+20^\circ\text{C}$ и влажности воздуха 50–60%. Животные имели свободный доступ к корму и питьевой воде.

Морские свинки были разделены на три группы по 5 животных в каждой: контроль — физиологический раствор, 1 группа — рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа в дозе 0,665 мг/кг, 2 группа — рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа в дозе 1,33 мг/кг. Использованные дозы препарата соответствовали 5- и 10-кратной высшей суточной дозе, рекомендованной для человека (10 мг для человека или 0,133 мг/кг) [2]. Препарат вводили внутривенно в дозе 0,665 мг/кг дважды в сутки через день. Разрешающую дозу вводили внутривенно морским свинкам через 14 и 21 сут после сенсibilизации. Учёт интенсивности анафилактического шока оценивали с помощью индекса по Weigle [8].

Исследование влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у морских свинок

Исследования выполнены на 15 пёстрых самцах морских свинок со средней массой тела 290 ± 20 г, которые были разделены на три группы по 5 животных в каждой. Группы и дозы были аналогичными предыдущему эксперименту. Животных сенсibilизировали 5-кратным внутримышечным введением рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы с интервалом в 5 сут. На 10 сут после последней сенсibilизации у животных на коже спины на участке 3×3 см выстригали шерсть и внутрикожно вводили 0,1 мл раствора рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы, в другую точку — такой же объём физиологического раствора. Учёт реакции проводили визуально по шкале кожных проб С.В. Суворова (1974) в баллах через 4 и 24 ч после внутрикожного введения разрешающей дозы.

Исследование влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на клеточность подколенного лимфоузла у мышей

Исследования выполнены на 10 самцах мышей-гибридов $F_1(CBA \times C_{57}Bl_6)$ со средней массой тела 18 ± 2 г, полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая» (ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России). Животные содержались в стандартных условиях вивария в вентилируемых клетках с 12-часовым режимом светового дня, при температуре воздуха $+20^\circ\text{C}$ и влажности воздуха 50–60%. Животные имели свободный доступ к корму и питьевой воде. Мышам в подушечку левой задней лапы вводили 50 мкл рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы в дозе 1,33 мг/кг, в подушечку правой задней лапы — физиологический раствор. Через 7 сут у мышей определяли клеточность левого и правого

подколенных лимфоузлов, а затем вычисляли относительный индекс путём деления показателей левого лимфоузла на аналогичные показатели правого лимфоузла [8].

Исследование влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на количество ядросодержащих и антителообразующих клеток в селезёнке у мышей

Опыт основан на определении числа ядросодержащих и антителообразующих клеток (АОК) в селезёнке по Эрне в соответствии с общепринятыми методами [9]. Исследования выполнены на 35 самцах мышей-гибридов $F_1(CBA \times C_{57}Bl_6)$ со средней массой тела 18 ± 2 г, которые были разделены на 7 групп по 5 животных в каждой. Мышей иммунизировали внутривенным введением эритроцитов барана (ЭБ) («НПО «Микроген», Россия) в дозе 5×10^8 клеток/мышь. Животные группы 1 и 2 получали рекомбинантную неиммуногенную стафилокиназу внутрибрюшинно в дозах 1,33 и 2,66 мг/кг соответственно за сутки до иммунизации ЭБ (день -1), группы 3 и 4 — в тех же дозах через 1 ч после иммунизации (день 0), группы 5 и 6 — через 24 ч после иммунизации ЭБ (день +1). Контрольным мышам в «день +1» вводили физиологический раствор. На 5 сут после иммунизации у мышей извлекали селезёнку, которую дезинтегрировали в растворе Хенкса ($\text{pH}=7,4$). Суспензию клеток отделяли от элементов стромы фильтрованием через двуслойный капроновый фильтр, затем 3 раза отмывали и центрифугировали (ELMI CM-50, Латвия) при 200 г в течение 5 мин. После лизиса клеток эритроидного ряда раствором кислоты уксусной 3% в полученной суспензии подсчитывали количество кариоцитов на счётчике клеток (Пикоскель ПС-4М, Венгрия).

Исследование влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей

Исследования выполнены на 35 самцах мышей-гибридов $F_1(CBA \times C_{57}Bl_6)$ со средней массой тела 18 ± 2 г, которые были разделены на 7 групп по 5 животных в каждой. Мышей иммунизировали подкожным введением в межлопаточную область ЭБ в дозе 2×10^8 клеток/мышь. Схема введения рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы и распределение по группам было аналогичным предыдущему эксперименту. На 5 сут после иммунизации все животные получали в левую заднюю лапу разрешающую инъекцию ЭБ в дозе 1×10^8 клеток/мышь в объёме 50 мкл («опытная лапа»). В подушечку контралатеральной лапы («контрольная лапа») вводили физиологический

раствор. Результаты реакции регистрировали через 24 ч путём взвешивания «контрольной» и «опытной» лап. Индекс реакции (Хаитов Р.М., 2000) вычисляли как отношение разницы масс «опытной» и «контрольной» лап к массе «контрольной» лапы.

Статистическая обработка

Статистический анализ проведён при помощи языка R 4.2 (R Foundation, США). Для непрерывных показателей приведены среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$). Сравнение распределений в независимых группах для непрерывных параметров сделано при помощи критерия Манна–Уитни, для дискретных — при помощи точного критерия Фишера. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Клинические исследования

В соответствии с разрешением Минздрава России № 261 от 16.05.2014 г. в период с октября 2014 по август 2016 гг. было проведено многоцентровое открытое рандомизированное сравнительное исследование эффективности и безопасности однократного болюсного введения препарата рекомбинантной стафилокиназы (15 мг) и препарата тканевого активатора плазминогена тенекеплаза (30–50 мг) у пациентов с ОИМnST на базе 11 ведущих медицинских учреждений России [10, 11]. Перед включением в исследование все пациенты подписали форму информированного согласия. Исследование одобрено Советом по этике Минздрава России (протокол № 81 от 15.04.2014 г.) и локальными комитетами по этике на базе исследовательских центров.

Клиническое исследование влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на образование специфических антител

В исследовании приняли участие 382 пациента. *Критерии включения:* диагноз ОИМ с подъёмом сегмента ST более 1 мм в двух и более последовательных отведениях от конечностей и/или более 2 мм в грудных отведениях в первые 12 ч от начала заболевания. *Критерии не включения:* кровотечения, геморрагический инсульт, ишемический инсульт в предшествующие 6 мес, заболевания с повышенным риском кровотечений. Полный перечень критериев включения и не включения в исследование, а также критерии оценки эффективности и безопасности тромболитической терапии опубликованы ранее [10, 11].

Пациенты были рандомизированы в две группы (по $n=191$) для назначения рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы (Фортелизин®, ООО «СупраГен», Россия) или тенекеплазы (Метализе®,

Boehringer Ingelheim International, Германия). Рандомизация осуществлялась методом конвертов, блоками по 4 препарата (2 — рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа и 2 — тенекеплаза). Последовательность рандомизационных номеров сгенерирована независимым биостатистиком. Рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа вводилась в дозе 15 мг вне зависимости от массы тела болюсно в течение 10–15 сек, тенекеплаза — болюсно в дозе 30–50 мг в зависимости от массы тела, согласно инструкции по медицинскому применению¹. У 100 пациентов из группы рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы проводился забор крови на определение титра антител к рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназе и нейтрализующей активности плазмы до ее введения, а также на 7, 14 и 30 сут после введения.

Определение титра специфических антител проводили в ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН с помощью твердофазного непрямого иммуноферментного анализа по стандартной методике [12]. Исследуемые пробы плазмы, полученные от пациентов после однократного внутривенного введения препарата, разводили буферным раствором (20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 0,005% твин-20, pH=8,0) 1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400, 1:25600, 1:102400. В лунки вносили по 100 мкл разведений исследуемых проб. Планшет инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C. После инкубации удаляли жидкость и трижды промывали лунки буферным раствором (20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 0,005% твин-20, pH=8,0). В каждую лунку вносили по 100 мкл раствора вторичных антител кролика к IgG человека, меченных пероксидазой хрена (1:1000, pH=8,0) (Sigma, США) и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C. После инкубации лунки вновь промывали буферным раствором. Вносили 100 мкл субстрата (0,07% ортофенилендиамин, 0,06% H₂O₂, pH=5,0) в каждую лунку. Инкубировали при комнатной температуре в течение 3–5 мин до появления окрашивания в отрицательном контрольном образце. Вносили в каждую лунку по 50 мкл стоп-реагента (раствор кислоты серной 10%). Через 15 мин после добавления стоп-реагента измеряли оптическую плотность в каждой лунке при 490 нм на фотометре для микропланшетов «ImmunoChem-2100» (США). Определяли максимальное разведение образца, при котором значение оптической плотности положительных лунок трёхкратно превышало соответствующее значение отрицательных лунок. Титр специфических

¹ Метализе®. Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. — [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=123f0609-001e-4e9c-8830-34e99ca499df

антител к рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназе рассчитывали по формуле:

$$T = \frac{1}{P_{\max}}$$

где P_{\max} – максимальное разведение, при котором значение оптической плотности в положительных лунках трёхкратно превышает значение оптической плотности в отрицательных лунках.

Клиническое исследование нейтрализующей активности плазмы пациентов после введения рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы

Определение нейтрализующей активности проводили в соответствии с методикой D. Collen [13]. Разведения исследуемых проб готовили аналогично предыдущему эксперименту. В микропробирки вносили 5 мкл исследуемой пробы и 5 мкл раствора препарата в диапазоне концентраций 0,2–100 мкг/мл, перемешивали и вносили 10 мкл раствора тромбина (5 ед. NIH/мл, рН=7,4). Образцы инкубировали в течение 20 мин при температуре 37°C. Определяли диапазон концентраций рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы, при которых наблюдался момент лизиса тромба и время. Для каждой исследуемой пробы строили график зависимости времени лизиса тромба (мин) от концентрации препарата (мкг/мл). С помощью графиков определяли нейтрализующую активность — концентрацию препарата, при которой время лизиса тромба составляло 20 мин.

Статистическая обработка

Статистический анализ проведён при помощи языка R 4.2 (R Foundation, США). Непрерывные переменные описаны в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$) или медианой и квартилями ($Me [Q1; Q3]$). Категориальные переменные представлены абсолютными и относительными частотами. Для сравнения непрерывных переменных использовали U -критерий Манна-Уитни, для сравнения категориальных переменных применяли двусторонний точный тест Фишера. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Доклинические исследования

Исследование влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на реакцию гиперчувствительности немедленного типа (анафилактического шока) у морских свинок

Установлено, что после двукратного внутрибрюшинного введения морским свинкам на 14 сут сенсibilизации рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы в дозе 1,33 мг/кг

(10-кратная высшая суточная терапевтическая доза для человека) анафилактического шока не вызывало (табл. 1). Изменений в поведении животных — их общем состоянии, показателях жизненно важных функций по сравнению с контрольными животными, получавшими физиологический раствор, — не выявлено (индекс реакции по Weigle равен 0). Таким образом, рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа не вызывала анафилактический шок у морских свинок.

Исследование влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у морских свинок

После сенсibilизации морских свинок рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназой в течение 25 сут внутрикожного введения препарата, случаев гиперемии, признаков отёка или воспаления не обнаружено ни у одного из животного экспериментальных групп (0 баллов по шкале С.В. Суворова). Поведение и состояние животных соответствовало особям контрольной группы.

Исследование влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на клеточность подколенного лимфоузла у мышей

Через 7 сут после введения рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы в подушечку левой задней лапы мыши в 10-кратной высшей суточной дозе, рекомендованной для человека, определяли клеточность правого и левого подколенных лимфоузлов в сравнении с контролем. Результаты подсчёта представлены в таблице 2. Достоверных различий между животными выявлено не было.

Индекс клеточности подколенных лимфоузлов «опытной» и «контрольной» лап составил 0,91². Таким образом, рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа не влияла на клеточность подколенных лимфоузлов и не обладала аллергизирующими свойствами.

Исследование влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на количество ядродержащих и антителообразующих клеток в селезёнке у мышей

Препарат вводился мышам за 1 сут, в день введения ЭБ, либо в день после иммунизации ЭБ в дозах, в 10 и в 20 раз превышающих высшую суточную дозу для человека. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Представленные в таблице 3 данные показывают, что однократное внутрибрюшинное

² Индекс 1,00 свидетельствует о равенстве показателей клеточности правого и левого лимфоузлов. Чем он меньше, тем больше различие.

введение мышам рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы не влияло на клеточность селезёнки.

Из данных результатов подсчёта количества АОК в селезёнке мышей на 5 сут после иммунизации, представленных в таблице 4, видно, что достоверные различия в количестве АОК между группами животных, получавших рекомбинантную неиммуногенную стафилокиназу в различных дозах в разные сроки относительно иммунизации ЭБ и контрольными животными, отсутствовали.

Таким образом, препарат не оказывал влияния на число ядросодержащих клеток и АОК в селезёнке мышей, иммунизированных ЭБ, и, следовательно, не влиял на клеточный и гуморальный иммунный ответ.

Изучение влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей

После иммунизации мышей ЭБ и рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназой в левую заднюю лапу вводили разрешающую инъекцию ЭБ, а в подушечку контралатеральной лапы — физиологический раствор. Индекс реакции животных разных групп представлен в таблице 5.

Анализ данных, представленных в таблице 5, свидетельствует о том, что препарат в испытанных дозах 1,33 и 2,66 мг/кг и схемах сенсibilизации не оказывал влияния на формирование клеточного иммунитета.

Таким образом, при проведении доклинических исследований алергизирующих и иммунотоксичных свойств рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы было установлено, что препарат при введении морским свинкам и мышам в дозах, в 5, 10 и 20 раз превышающих терапевтические для человека, не обладает влиянием на клеточный и гуморальный иммунный. Полный комплекс доклинических исследований рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы, включающий оценку острой и подострой (субхронической) токсичности, мутагенности, генотоксичности, эмбриотоксичности, репротоксичности и тератогенности также показал ее безопасность и отсутствие токсичных свойств [15], что позволило получить разрешение для проведения клинических исследований препарата в качестве фибринолитического средства у пациентов с ОИМпСТ.

Клинические исследования

Клиническое исследование влияния рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на образование специфических антител и нейтрализующей активности плазмы пациентов

В исследование было включено 100 пациентов с ОИМпСТ, которые получали препарат рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы

однократно болюсно в дозе 15 мг. Демографические, антропометрические, данные анамнеза, клинические характеристики и временные интервалы представлены в таблице 6.

К мужскому полу принадлежали 76% участников исследования. Средний возраст составил $58,9 \pm 9,9$ лет. Доля пациентов с артериальной гипертонией составила 75%, предшествующим инфарктом миокарда — 12%, нарушениями липидного обмена — 86%. В исследуемой популяции преобладали нижние инфаркты (56%).

Оценка эффективности и безопасности тромболитической терапии представлена в таблице 7.

Снижение сегмента ST через 90 мин на 50% от исходного отмечено у 80% пациентов. Восстановление коронарного кровотока по критериям TIMI 2+TIMI 3 наблюдалось у 70%. Смерть от всех причин составила 3%. При использовании рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы не зарегистрировано внутричерепных кровоизлияний. Ни у одного пациента с кардиогенным шоком в группах не наблюдалось больших кровотечений и геморрагического инсульта. В результате исследования алергических реакций не зарегистрировано.

При исследовании титров специфических антител у пациентов с ОИМпСТ, которым вводили рекомбинантную неиммуногенную стафилокиназу установлено, что у 70 (70%) пациентов специфические антитела обнаружены не были. У 30 (30%) пациентов специфические антитела были обнаружены с низким титром — в диапазоне 1/100–1/800.

При определении нейтрализующей активности плазмы крови пациентов с ОИМпСТ, которым вводили рекомбинантную неиммуногенную стафилокиназу, было выявлено, что пробы 70 (70%) пациентов не обладали нейтрализующей активностью. Пробы остальных 30 (30%) пациентов характеризовались нейтрализующей активностью в дозе $0,33 \pm 0,02$ мкг/мл. Ранее было показано, что средние значения нейтрализующей активности нативной стафилокиназы были кратно выше в диапазоне 9–93 мкг/мл [14–16].

Таким образом, среднее значение нейтрализующей активности плазмы крови пациентов после введения рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы в 30–310 раз ниже, чем после введения нативной стафилокиназы.

С учетом того, что определяемая концентрация рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы в крови при однократном болюсном введении в дозе 15 мг составляет 2,5 мкг/мл, то есть в 7,8 раз выше, чем нейтрализующая активность проб плазмы крови (0,33 мкг/мл), наблюдаемой только у 30% пациентов, можно сделать вывод о том, что введение препарата не приводит к образованию антител, способных нейтрализовать его действие при повторном введении.

Таблица 1 – Влияние рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на реакцию гиперчувствительности немедленного типа у морских свинок

Группы животных, дозы	Индекс реакции по Weigle, M±SD	p
Контроль	0,0±0,00	–
1 группа, 0,665 мг/кг	0,0±0,00	1,00
2 группа, 1,33 мг/кг	0,0±0,00	1,00

Таблица 2 – Влияние рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на клеточность подколенных лимфоузлов у мышей-гибридов F₁(CBAxС₅₇Bl₆)

Группы животных, дозы	Клеточность подколенных лимфоузлов, млн/мл, M±SD	p
Контроль	0,78±0,07	–
1 группа, 1,33 мг/кг	0,71±0,07	0,95

Таблица 3 – Влияние рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на клеточность селезёнки мышей F₁(CBAxС₅₇Bl₆), иммунизированных эритроцитами барана

Группы животных, дозы	Количество кариоцитов, 10 ⁷ /селезёнку, M±SD	p
Контроль	26,88±1,67	–
1 группа, 1,33 мг/кг «день -1»	25,64±0,93	0,89
2 группа, 2,66 мг/кг «день -1»	26,62±2,77	0,98
3 группа, 1,33 мг/кг «день 0»	28,44±1,84	0,91
4 группа, 2,66 мг/кг «день 0»	24,48±2,96	0,82
5 группа, 1,33 мг/кг «день +1»	27,71±1,45	0,85
6 группа, 2,66 мг/кг «день +1»	28,48±1,81	0,95

Примечание: животные группы 1 и 2 получали рекомбинантную неиммуногенную стафилокиназу внутрибрюшинно в дозах 1,33 и 2,66 мг/кг соответственно за сутки до иммунизации ЭБ («день -1»), группы 3 и 4 — в тех же дозах через 1 ч после иммунизации («день 0»), группы 5 и 6 — через 24 ч после иммунизации ЭБ («день +1»).

Таблица 4 – Влияние рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на количество АОК у мышей F₁(CBAxС57Bl₆), иммунизированных эритроцитами барана

Группы животных, дозы	Количество антителообразующих клеток в селезёнке, 1×10 ⁴ , M±SD	p
Контроль	8,66±1,73	–
1 группа, 1,33 мг/кг «день -1»	10,29±1,32	0,72
2 группа, 2,66 мг/кг «день -1»	8,65±2,22	0,95
3 группа, 1,33 мг/кг «день 0»	9,39±1,41	0,80
4 группа, 2,66 мг/кг «день 0»	9,03±1,14	0,82
5 группа, 1,33 мг/кг «день +1»	9,96±1,95	0,78
6 группа, 2,66 мг/кг «день +1»	10,12±0,68	0,75

Примечание: животные группы 1 и 2 получали рекомбинантную неиммуногенную стафилокиназу внутрибрюшинно в дозах 1,33 и 2,66 мг/кг соответственно за сутки до иммунизации ЭБ («день -1»), группы 3 и 4 — в тех же дозах через 1 ч после иммунизации («день 0»), группы 5 и 6 — через 24 ч после иммунизации ЭБ («день +1»).

Таблица 5 – Влияние рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы на развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей F₁(CBAxС₅₇Bl₆)

Группы животных, дозы	Индекс реакции, M±SD	p (в сравнении с контролем)
Контроль	19,81±2,43	–
1 группа, 1,33 мг/кг «день -1»	17,96±2,64	0,75
2 группа, 2,66 мг/кг «день -1»	19,91±2,59	0,96
3 группа, 1,33 мг/кг «день 0»	24,52±3,85	0,12
4 группа, 2,66 мг/кг «день 0»	23,48±2,77	0,35
5 группа, 1,33 мг/кг «день +1»	22,16±1,62	0,59
6 группа, 2,66 мг/кг «день +1»	20,46±0,94	0,79

Примечание: животные группы 1 и 2 получали рекомбинантную неиммуногенную стафилокиназу внутрибрюшинно в дозах 1,33 и 2,66 мг/кг соответственно за сутки до иммунизации ЭБ («день -1»), группы 3 и 4 — в тех же дозах через 1 ч после иммунизации («день 0»), группы 5 и 6 — через 24 ч после иммунизации ЭБ («день +1»).

Таблица 6 — Исходные характеристики пациентов

Характеристики	Показатель (n=100)
Пол, мужчин/женщин	76/23 (76%/23%)
Возраст, лет	58,9±9,9
Пациентов старше 75 лет	6 (6%)
Вес, кг	83,8±14,2
Индекс массы тела, кг/м ²	28,5±4,5
Инфаркт миокарда	12 (12%)
Артериальная гипертензия	75 (75%)
Сахарный диабет II типа	14 (14%)
Дислипидемия	86 (86%)
Курение	39 (39%)
Подъем сегмента ST, мм	3,58±1,96
САД, мм рт. ст.	118,6±8,2
ДАД, мм рт. ст.	74,7±7,2
ЧСС, уд/мин	75,9±14,7
Локализация ОИМПСТ:	
	передний 42 (42%)
	нижний 56 (56%)
	другая 2 (2%)
Тип сердечной недостаточности по Killip:	
	I 87 (87%)
	II 8 (8%)
	III 3 (3%)
	IV 2 (2%)
Время «боль-игла», мин	205,8±104,7

Таблица 7 – Оценка эффективности и безопасности тромболитической терапии

Критерий	Показатель (n=100), абс. (%)
Снижение сегмента ST через 90 мин на 50%	80 (80%)
Восстановление коронарного кровотока по критериям TIMI:	
	0 24 (24%)
	1 6 (6%)
	2 32 (32%)
	3 38 (38%)
	2+3 70 (70%)
Смерть от всех причин	3 (3%)
Кардиогенный шок	4 (4%)
Повторный инфаркт миокарда	4 (4%)
Большие кровотечения	1 (1%)
Внутричерепное кровоизлияние	0 (0%)
Малые кровотечения	3 (3%)
Аллергические реакции	0 (0%)

ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с Правилами надлежащей клинической практики, утверждёнными Евразийской экономической комиссией, оценка алергизирующих, иммунотоксичных и иммуногенных свойств оригинальных молекул является одним из важнейших этапов исследований, необходимых для дальнейших клинических испытаний и регистрации лекарственного препарата. Иммуногенность может провоцировать такие

серьёзные побочные явления со стороны иммунной системы, как анафилактический шок и отёк Квинке. В соответствии с Клиническими рекомендациями Минздрава России «Анафилактический шок» (2020)³, под анафилактическим шоком понимается «острая недостаточность кровообращения, проявляющаяся снижением систолического артериального давления

³ Клинические рекомендации Минздрава России «Анафилактический шок» (2020). – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/263_2

ниже 90 мм рт. ст. или на 30% от рабочего уровня и приводящая к гипоксии жизненно важных органов». Следует подчеркнуть, что такой диагноз без выраженных гемодинамических нарушений неправомерен и должен рассматриваться как анафилаксия. Анафилактический шок относится к реакции гиперчувствительности немедленного типа, протекающей с участием иммуноглобулинов класса E, фиксированных на поверхности мембран базофилов и тучных клеток⁴. От анафилактического шока следует отличать ангионевротический отёк (отёк Квинке) — локализованный транзиторный остро возникающий отёк кожи или слизистых оболочек, а также крапивницу — группу заболеваний, характеризующихся развитием зудящих волдырей или ангиоотёков⁵.

В данной статье представлены результаты доклинических и клинических исследований аллергизирующих, иммунотоксичных и иммуногенных свойств молекулы рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы. При проведении комплекса доклинических исследований установлено, что препарат не обладает влиянием на клеточный и гуморальный иммунный ответ у морских свинок и мышей в дозах, в 5, 10 и 20 раз превышающих терапевтические для человека. Рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа не вызывает анафилактический шок и развитие отёка у экспериментальных животных при внутривенном, внутримышечном и подкожном введении. В экспериментах по ингаляционному введению рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы мышам с острым респираторным дистресс-синдромом [17] было установлено, что препарат также не вызывал аллергические реакции и не оказывал раздражающего действия на дыхательные пути, сокращал отложение фибриногена в лёгких и оказывал нормализующее влияние на концентрацию провоспалительных цитокинов — ИЛ-1α, ИЛ-17A, ИЛ-6.

Клиническое исследование нейтрализующей активности плазмы крови пациентов, которым вводилась рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа, показало, что пробы, взятые у 70% пациентов с ОИМпСТ не обладают нейтрализующей активностью в отношении препарата. У остальных 30% пациентов средние значения нейтрализующей активности плазмы крови после однократного введения препарата не превышали 0,3 мкг/мл, что в 30–310 раз ниже, чем после введения нативной молекулы стафилокиназы. Эти значения существенно ниже концентрации препарата в крови, поэтому они не способны нейтрализовать его действие в случае повторного введения.

В 2012 году по результатам проведённых

доклинических и клинических исследований Минздрав России зарегистрировал оригинальный тромболитический препарат рекомбинантного белка, содержащего аминокислотную последовательность стафилокиназы — Фортелизин® (производство ООО «СупраГен», Россия; регистрационное удостоверение №ЛП-001941 от 18.12.2012) для лечения пациентов с ОИМпСТ.

По данным регистров мониторинга безопасности и эффективности рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы, с 2012 года препарат использован более чем у 50 тыс. пациентов с ОИМпСТ [18] и более чем у 20 тыс. с ишемическим инсультом. По данным IMS Health по состоянию на март 2025 г. препарат рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы применён более чем у 200 тыс. пациентов. За указанный период в автоматизированной информационной системе Росздравнадзора было зарегистрировано 18 (0,009%) сообщений о развитии анафилактического шока после применения препарата. Это нашло отражение в разделе «Побочное действие»⁶ в инструкции по медицинскому применению препарата, где указано, что такие нарушения со стороны иммунной системы, как анафилактоидные реакции, встречаются очень редко (<1 на 10 тыс. случаев). Таким образом, отсутствие иммуногенных свойств рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы и ее высокая безопасность в отношении иммунной системы подтверждены многолетним опытом применения у широкого круга пациентов.

В проведенных клинических исследованиях рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы не было зарегистрировано таких серьезных нежелательных явлений, как анафилактический шок, крапивница или отёк Квинке.

В исследованиях ФРИДОМ1 [10, 11] рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа в дозе 15 мг была не менее эффективна, чем тенектеплаза по показателю восстановления коронарного кровотока по данным коронарографии (70 vs 71%, $p=0,76$) и ЭКГ (8% vs 80%, $p=0,81$); отсутствие внутричерепных кровоизлияний и высокая эффективность рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы позволили ее зарегистрировать для лечения пациентов с ОИМпСТ. В настоящее время рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа входит в Клинические рекомендации и стандарты лечения пациентов с ОИМпСТ. В Евразийских клинических рекомендациях по диагностике и лечению острого коронарного синдрома с подъемом сегмента ST в качестве преимуществ препарата отдельно указано отсутствие

⁴ Там же.

⁵ Там же.

⁶ Фортелизин®. Государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации. — [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=9721d84a-5efa-4a24-b940-d711798bd51c

антигенности. Приказом Минздрава России № 1165н от 28.10.2020 г. рекомбинантный белок, содержащий аминокислотную последовательность стафилокиназы, включён в обязательные требования к комплектации лекарственными препаратами и медицинскими изделиями упаковок и наборов для оказания скорой медицинской помощи.

По данным регистра РЕГИОН-ИМ ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, 36% пациентов с ОИМпСТ получают тромболитическую терапию с использованием рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы, а на догоспитальном этапе этот показатель достигает 42%. Частота использования рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы в первичных сосудистых отделениях достигает 51% [19].

В исследовании ФРИДА было показано, что рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа является эффективным и безопасным тромболитическим средством для лечения пациентов с ишемическим инсультом в течение 4,5 ч от начала проявления первых симптомов [21, 22]. По показателю количества пациентов с хорошим функциональным восстановлением (0–1 балл по модифицированной шкале Рэнкина) препарат был не менее эффективен, чем алтеплаза (50 vs 41%, $p=0,10$). Рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа применяется в виде быстрого однократного болюса (10 с) в единой дозе 10 мг у пациентов с ишемическим инсультом с любой массой тела. В 2024 году препарат рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы был внесён в клинические рекомендации по лечению ишемического инсульта в первые 4,5 часа от начала заболевания.

В исследовании ФОРПЕ представлены результаты использования рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы у пациентов с массивной ТЭЛА [22, 23]. Рекомбинантная стафилокиназа не уступает алтеплазе по первичной конечной точке эффективности «смертность от всех причин в течение 7 дней» (2 vs 3%, $p=1,00$) и обладает высоким профилем безопасности. Применение рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы не сопровождалось развитием больших кровотечений, которые возникали при применении препарата алтеплаза (0 vs 3%, $p=0,06$) и геморрагического инсульта (0 vs 2%, $p=0,25$). По данным МСКТ с контрастированием легочных артерий, показано значительное уменьшение тромботических масс (65,8 vs 47,4%, $p < 0,001$) и сокращение размеров правого желудочка (50 vs 39 мм, $p < 0,001$) через 24 ч после проведения тромболиза рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназой. В настоящее время начато двойное слепое плацебо контролируемое клиническое исследование

рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы у пациентов с ТЭЛА промежуточно-высокого риска (разрешение Минздрава России № 106 от 21.03.2024 г., clinicaltrials.gov № NCT06362746) [24].

Проводится клиническое исследование рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы при ее интраартериальном интратромбальном введении у пациентов с тромбозом артерий нижних конечностей в сравнении с хирургическими методами лечения ФОРПАТ (исследователь-координатор — академик И.И. Затевахин, разрешение Минздрава России № 184 от 18.03.2022 г., clinicaltrials.gov № NCT05372718) [25].

Наряду с Российской Федерацией, препарат рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы зарегистрирован в ряде стран СНГ (Таджикистан, Туркменистан) и в настоящее время приходит регистрацию в странах ЕАЭС, Азербайджане, Грузии, Узбекистане.

Ограничения исследования

В представленном клиническом исследовании препарат рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы вводился в соответствии с инструкцией по медицинскому применению однократно болюсно. Исследования после болюсно-инфузионного введения препарата не проводились. Также не проводились исследования нейтрализующей активности плазмы крови и титров специфических антител после повторного применения препарата. Клинический опыт его двукратного использования свидетельствует о сохранении эффективности и об отсутствии нейтрализующей активности плазмы крови, что было показано у пациента с массивной ТЭЛА на фоне осколочного ранения [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В условиях ежегодного увеличения количества процедур тромболиза следует учитывать риски возникновения нежелательных явлений. В этой связи крайне актуальным является проведение всестороннего изучения алергизирующих и иммунотоксичных свойств молекулы рекомбинантной неиммуногенной стафилокиназы в доклинических и клинических исследованиях. По результатам полного комплекса проведённых испытаний было убедительно доказано, что рекомбинантная неиммуногенная стафилокиназа не обладает алергизирующими, иммуногенными и иммунотоксичными свойствами. Полученные в ходе настоящих исследований данные, несомненно, будут способствовать более активному распространению тромболитической терапии с использованием неиммуногенной стафилокиназы, что в перспективе будет повышать качество оказания медицинской помощи населению.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.) (№ 122030100170-5).

Неиммуногенная рекомбинантная стафилокиназа предоставлена ООО «СупраГен» (Россия).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Маркин С.С. — разработка дизайна исследования, редактирование и окончательное утверждение текста статьи; Иванов С.В. — написание текста статьи; Белецкий И.П. — разработка дизайна исследования, администрирование; Захарова М.В. — проведение экспериментов, статистическая обработка данных; Пономарев Э.А. — проведение клинического исследования; Арзамасцев Е.В. — проведение экспериментов, статистическая обработка данных. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 // *Lancet*. – 2020. – Vol. 396, No. 10258. – P. 1204–1222. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30925-9. Erratum in: *Lancet*. – 2020. – Vol. 396, No. 10262. – P. 1562. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32226-1
2. Collen D. Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-selective thrombolytic agent // *Nature Medicine*. – 1998. – Vol. 4, No. 3. – P. 279–284. DOI: 10.1038/nm0398-279
3. Christener R.B., Boyle M.D. Role of Staphylokinase in the acquisition of plasmin(ogen) dependent enzymatic activity by Staphylococci // *J Infect Dis*. – 1986. – Vol. 173, No. 1. – P. 104–112. DOI: 10.1093/infdis/173.1.104
4. Verstraete M. Third-Generation Thrombolytic Drugs // *Am J Med*. 2000. – Vol. 109, No. 1. – P. 52–58. DOI: 10.1016/S0002-9343(00)00380-6
5. Toul M., Nikitin D., Marek M., Damborsky J., Prokop Z. Extended mechanism of the plasminogen activator staphylokinase revealed by global kinetic analysis: 1000-fold higher catalytic activity than that of clinically used alteplase // *ACS Catalysis*. – 2022. – Vol. 12. – P. 3807–3814. DOI: 10.1021/acscatal.1c05042
6. Маркин С.С., Семенов А.М., Марков В.А., Низов А.А., Пономарев Э.А., Лебедев П.А. Клиническое исследование отечественного фибринселективного тромболитического препарата Фортелизин® (III фаза) // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. – 2012. – № 1. – С. 105–110. EDN: OPPLCH
7. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in guinea pig and rabbit // *Journal of Immunology*. – 1960. – Vol. 85. – P. 469–477.
8. Descotes J., Verdier F. Popliteal lymph node assay. In: *Methods in Immunotoxicology*, Volume 1. Wiley-Liss, Inc., 1995.
9. Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells // *Science*. – 1963. – Vol. 140, No. 3565. – P. 405.
10. Марков В.А., Дупляков Д.В., Константинов С.Л., Клейн Г.В., Аксентьев С.Б., Платонов Д.Ю., Вышлов Е.В., Пономарев Э.А., Рабинович Р.М., Макаров Е.Л., Кулибаба Е.В., Юневич Д.С., Крицкая О.В., Баранов Е.А., Талибов О.Б., Герасимец Е.А. Фортелизин® в сравнении с Метализе® при инфаркте миокарда с подъемом сегмента ST: однолетние результаты и клинические исходы многоцентрового рандомизированного исследования ФРИДОМ1 // *Российский кардиологический журнал*. – 2018. – № 11. – С. 110–116. DOI: 10.15829/1560-4071-2018-11-110-116
11. Марков В.А., Дупляков Д.В., Константинов С.Л., Клейн Г.В., Аксентьев С.Б., Платонов Д.Ю., Вышлов Е.В., Пономарев Э.А., Рабинович Р.М., Макаров Е.Л., Кулибаба Е.В., Юневич Д.С., Крицкая О.В., Баранов Е.А., Талибов О.Б., Куценко В.А., Орловский А.А., Вязова Н.Л., Колединский А.Г., Семенов А.М., Семенов М.П., Яровая Е.Б., Ускач Т.М., Шахнович Р.М., Терещенко С.Н., Маркин С.С. Расширенные результаты применения лекарственного препарата Фортелизин® в исследовании ФРИДОМ1 и реальной клинической практике // *Российский кардиологический журнал*. – 2022. – Т. 27, № 8. – С. 5178. DOI: 10.15829/1560-4071-2022-5178
12. Lequin R.M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) // *Clinical Chemistry*. – 2005. – Vol. 51, No. 12. – P. 2415–2418. DOI: 10.1373/clinchem.2005.051532
13. Collen D., Moreau H., Stockx L., Vanderschueren S. Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. II. Thrombolytic properties and antibody induction // *Circulation*. – 1996. – Vol. 94. – P. 207–216.
14. Маркин С.С., Семенов А.М., Арзамасцев Е.В., Марков В.А., Вышлов Е.В., Низов А.А., Аксентьев С.Б., Пономарев Э.А., Гридасов Г.Н., Лебедев П.А., Барбараш О.Л., Кашталап В.В. Доклинические и клиническое исследование фибринселективного тромболитического препарата Фортелизин® // *Медицинский академический журнал*. – 2012. – Т. 12, № 1. – С. 80–86. EDN: QBXHQV
15. Collen D., Stockx L., Lacroix H., Suy R., Vanderschueren S. Recombinant Staphylokinase Variants With Altered Immunoreactivity IV. Identification of variants with reduced antibody induction but intact potency // *Circulation*. – 1997. – Vol. 95, No. 2. – P. 463–472.
16. Laroche Y., Heymans S., Capaert S., De Cock F., Demarsin E., Collen D. Recombinant staphylokinase variants with reduced antigenicity due to elimination of B-lymphocyte epitopes // *Blood*. – 2000. – Vol. 96, No. 4. – P. 1425–1432.
17. Markin S.S., Lapshin R.D., Baskina O.S., Korotchenko S.A., Mukhina I.V., Ivanov S.V., Semenov M.P., Beregovykh V.V., Semenov A.M.. Nebulized Non-Immunogenic

- Staphylokinase in the Mice Acute Lung Injury Model // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23, No. 16. – P. 9307. DOI: 10.3390/ijms23169307.
18. Терещенко С.Н., Багненко С.Ф., Марков В.А., Мирошниченко А.Г., Серебренников И.И., Крылов С.О., Лищенко А.Н., Горбачева С.М., Кузнецов В.В., Остроумова Л.А., Ихаев А.Б., Дупляков Д.В., Чефранова Ж.Ю., Константинов С.Л., Вышлов Е.В., Пономарев Э.А., Рабинович Р.М., Петрушин М.А., Куценко В.А., Колединский А.Г., Вязова Н.Л., Стрябкова Г.И., Ускач Т.М., Миннуллин И.П., Галенова Н.И., Труханова И.Г., Прохасько Л.В., Мухин С.И., Костылев В.В., Краузе О.В., Белова Л.П., Лесников Е.В., Жуков Г.П., Прибылов С.А., Фарсиянц А.В., Жиров А.В., Штегман О.А., Иванов В.Б., Тимощенко Е.С., Макаров Е.Л., Толстой О.А., Сачков Д.Ю., Карамова И.М., Рахматуллин А.Р., Костогрыз В.Б., Волков Е.С., Рукосуев Е.В., Юркин Е.П., Шахнович Р.М., Явелов И.С., Эрлих А.Д., Иванов С.В., Семенов А.М., Семенов М.П., Яровая Е.Б., Маркин С.С. Безопасность догоспитального тромболитического неиммунотромболитического стафилокиназой у 51021 пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST: данные ФРИДОМ-регистра // *Российский кардиологический журнал.* – 2025. – Т. 30, № 6. – С. 6355. DOI: 10.15829/1560-4071-2025-6355
 19. Бойцов С.А., Шахнович Р.М., Терещенко С.Н., Эрлих А.Д., Певзнер Д.В., Гулян Р.Г., Рытова Ю.К., Дмитриева Н.Ю., Вознюк Я.М., Мусихина Н.А., Назарова О.А., Погорелова Н.А., Санабасова Г.К., Свиридова А.В., Сухарева И.В., Филинова А.С., Шилко Ю.В., Ширикова Г.А. Особенности реперфузионной стратегии лечения пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST по данным Российского регистра острого инфаркта миокарда – РЕГИОН-ИМ // *Кардиология.* – 2024. – Т. 64, № 2 – С. 3–17. DOI: 10.18087/cardio.2024.2.n2601
 20. Gusev E.I., Martynov M.Yu., Nikonov A.A., Shamalov N.A., Semenov M.P., Gerasimets E.A., Yarovaya E.B., Semenov A.M., Archakov A.I., Markin S.S.; FRIDA Study Group. Non-immunogenic recombinant staphylokinase versus alteplase for patients with acute ischaemic stroke 4.5 h after symptom onset in Russia (FRIDA): a randomised, open label, multicentre, parallel-group, non-inferiority trial // *Lancet Neurology.* – 2021. – Vol. 20, No. 9. – P. 721–728. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00210-6
 21. Гусев Е.И., Мартынов М.Ю., Шамалов Н.А., Яровая Е.Б., Семенов М.П., Семенов А.М., Орловский А.А., Куценко В.А., Никонов А.А., Аксентьев С.Б., Юневич Д.С., Алашеев А.М., Андрюхагина О.В., Бобков В.В., Хорошавина К.В., Горбачев В.И., Коробейников И.В., Грешнова И.В., Добровольский А.В., Елеманов У.А., Жуковская Н.В., Захаров С.А., Чирков А.Н., Корсунская Л.Л., Нестерова В.Н., Никонова А.А., Низов А.А., Гиривенко А.И., Пономарев Э.А., Попов Д.В., Прибылов С.А., Семихин А.С., Тимченко Л.В., Жадан О.Н., Федянин С.А., Чефранова Ж.Ю., Лыков Ю.А., Чуприна С.Е., Воробьев А.А., Арчаков А.И., Маркин С.С. Неиммунотромболитический стафилокиназа — новый тромболитический препарат в лечении ишемического инсульта (результаты исследования ФРИДА) // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* – 2022. – Т. 122, № 7. – С. 56–65. DOI: 10.17116/jnevro202212207156
 22. Kirienko A.I., Leontyev S.G., Tereschchenko S.N., Yavelov I.S., Shakhnovich R.M., Erlikh A.D., Talibov O.V., Yarovaya E.B., Semenov A.M., Semenov M.P., Ivanov S.V., Beregovykh V.V., Archakov A.I., Markin S.S.; FORPE study group. Non-immunogenic recombinant staphylokinase versus alteplase for patients with massive pulmonary embolism: a randomised open-label, multicenter, parallel-group, non-inferiority trial FORPE // *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* – 2025. – Vol. 23, No. 2. – P. 657–667. DOI: 10.1016/j.jtha.2024.09.035
 23. Кириенко А.И., Леонтьев С.Г., Яровая Е.Б., Константинов С.Л., Орлов Б.Б., Мерай И., Дупляков Д.В., Олейников В.Е., Васильева Е.Ю., Пономарев Э.А., Прибылов С.А., Комарова А.Г., Бобков В.В., Рабинович Р.М., Клейн Г.В., Шогенов З.С., Карабач Ю.В., Золкин В.Н., Кулабухов В.В., Кашталап В.В., Ливнев К.А., Стрябкова Г.И., Яснопольская Н.В., Толмачева В.Ю., Чефранова Ж.Ю., Лыков Ю.А., Панина Е.С., Соловьева Н.В., Рыбин Е.В., Фурман Н.В., Кулибаба Е.В., Макухин В.В., Колединский А.Г., Муллова И.С., Черепанова Н.А., Павлова Т.В., Саввинова П.П., Либов И.А., Игошин А.С., Богомазов И.Ю., Печерина Т.Б., Люднев Л.О., Власов П.Н., Авдеева И.В., Максимов Д.Б., Комиссарова Е.В., Иванов В.С., Вязова Н.Л., Вышлов Е.В., Куртасов Д.С., Куценко В.А., Ивлев О.Е., Сопленкова А.Г., Терещенко С.Н., Явелов И.С., Шахнович Р.М., Эрлих А.Д., Талибов О.Б., Семенов А.М., Семенов М.П., Иванов С.В., Ромашова Ю.А., Береговых В.В., Арчаков А.И., Маркин С.С. Неиммунотромболитический стафилокиназа — тромболитический препарат в лечении массивной тромбоэмболии легочной артерии: результаты клинического исследования ФОРПЕ // *Российский кардиологический журнал.* – 2024. – Т. 29, № 11. – С. 6157. DOI: 10.15829/1560-4071-2024-6157
 24. Терещенко С.Н., Яровая Е.Б., Леонтьев С.Г., Явелов И.С., Шахнович Р.М., Эрлих А.Д., Ускач Т.М., Дупляков Д.В., Куценко В.А., Ивлев О.Е., Сопленкова А.Г., Семенов А.М., Семенов М.П., Иванов С.В., Маркин С.С. Неиммунотромболитический стафилокиназа у пациентов с массивной тромбоэмболией легочных артерий промежуточно-высокого риска: протокол многоцентрового двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования ФОРПЕ-2 // *Российский кардиологический журнал.* – 2025. – Т. 30, № 2. – С. 6291. DOI: 10.15829/1560-4071-2025-6291
 25. Затевахин И.И., Чупин А.В., Карпенко А.А. Интраартериальный тромболитический неиммунотромболитический стафилокиназой в сравнении с хирургическими методами лечения у пациентов с тромбозом артерий нижних конечностей различной степени ишемии: Протокол многоцентрового открытого рандомизированного клинического исследования ФОРПЕ // *Ангиология и сосудистая хирургия. Журнал имени академика А.В. Покровского.* – 2025. – Т. 31, № 2. – С. 33–41. DOI: 10.33029/1027-6661-2025-31-2-33-41
 26. Константинов С.Л., Стрябкова Г.И., Басараб А.И., Кравчук В.Н., Кажанов И.В., Иванов С.В., Чефранова Ж.Ю., Маркин С.С. Неиммунотромболитический стафилокиназа в лечении массивной тромбоэмболии легочной артерии высокого риска в раннем послеоперационном периоде по поводу осколочного ранения бедра. Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2023. – Т. 19, № 5. – С. 495–501. DOI: 10.20996/1819-6446-2023-2957

АВТОРЫ

Маркин Сергей Сергеевич — доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича». ORCID ID: 0000-0002-0242-0282. E-mail: phospholipovit@ibmc.msk.ru

Иванов Сергей Витальевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича». ORCID ID: 0000-0003-0438-9108. E-mail: ivanov-sv-tver@mail.ru

Белецкий Игорь Петрович — доктор биологических наук, профессор по кафедре, директор ФГБНУ «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН. ORCID ID: 0000-0003-0248-1840. E-mail: ipbeletsky@gmail.com

Захарова Марина Викторовна — кандидат

биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина» РАН. ORCID ID: 0000-0003-0158-7088. E-mail: zemskovam@mail.ru

Пономарев Эдуард Алексеевич — доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной хирургии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; заместитель главного врача по хирургической помощи ГУЗ «ГКБ СМП № 25». ORCID ID: 0000-0001-8391-6193. E-mail: ponomarev.ea@kb25.ru

Арзамасцев Евгений Вениаминович — доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории лекарственной токсикологии НИИЭК им. академика В.Н. Смирнова, ФГБУ «НМИЦК им. академика Е.И. Чазова» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1270-3067. E-mail: arz4146931@yandex.ru