



Протективная активность изотипов универсального антитела CR9114 против вируса гриппа A *in vivo*

Романовская-Романько Е.А.¹, Плотникова М.А.¹, Олейник В.А.¹, Шалджян А.А.¹,
Монахова В.С.¹, Балабашин Д.С.², Топорова В.А.^{1,2}, Алиев Т.К.^{2,3}, Клотченко С.А.¹✉

¹ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия;

³ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Аннотация

Введение. Грипп может вызывать заболевания разной степени тяжести, иногда приводящие к госпитализации или смерти. Одной из наиболее перспективных стратегий, направленных на снижение уровня заболеваемости и предотвращение рисков развития тяжёлых последствий инфекции, является применение антител широкого спектра действия, обеспечивающих эффективную защиту от заражения сезонными штаммами.

Цель исследования — оценка протективной активности антитела CR9114 изотипов IgG1 и IgA1 при системном и местном введении в отношении экспериментальной гриппозной инфекции у мышей.

Материалы и методы. Препараты полученных рекомбинантных антител CR9114 изотипов IgG1 или IgA1 интраназально вводили мышам линии BALB/c в дозе 100 или 20 мкг за 24 ч до заражения вирусом гриппа A/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе 10 МЛД₅₀ (профилактическая схема) и/или через 24 ч после инфицирования (терапевтическая схема). На протяжении 14 дней после заражения у животных оценивали динамику массы тела и проводили учёт летальности.

Результаты. Интраназальное введение антител изотипов IgG1 или IgA1 по лечебно-профилактической схеме приводило к снижению вирусной нагрузки в тканях респираторного тракта инфицированных мышей. При этом парентеральное введение IgG1 (но не IgA1) обеспечивало также снижение титра вируса в носовых ходах (но не в лёгких) мышей. Продемонстрировано, что профилактическое введение IgG1 или IgA1 обеспечивает полную защиту от летальной гриппозной инфекции.

Заключение. Интраназальное профилактическое введение человеческих нейтрализующих антител CR9114 изотипов IgG1 или IgA1 обеспечивает 100% выживаемость мышей при летальной инфекции вирусом гриппа A/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09. При этом Fc-фрагменты иммуноглобулинов разных изотипов, отвечающие за эффекторные функции, по-видимому, могут влиять на степень выраженности противовирусной защиты.

Ключевые слова: терапевтические моноклональные антитела; вирус гриппа; иммуноглобулины класса G; иммуноглобулины класса A; летальная модель гриппозной инфекции у мышей; оценка защитной эффективности антител *in vivo*

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева (протокол № 6 от 03.04.2025).

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (тема рег. № НИОКР в ЕГИСУ НИОКР 124021200034-5).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Романовская-Романько Е.А., Плотникова М.А., Олейник В.А., Шалджян А.А., Монахова В.С., Балабашин Д.С., Топорова В.А., Алиев Т.К., Клотченко С.А. Протективная активность изотипов универсального антитела CR9114 против вируса гриппа A *in vivo*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2025;102(6):783–793.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-767>

EDN: <https://www.elibrary.ru/EDEOBG>

Protective activity of CR9114 universal antibody isotypes against influenza A virus *in vivo*

Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko¹, Marina A. Plotnikova¹, Veronika A. Oleynik¹,
Aram A. Shaldzhyan¹, Varvara S. Monakhova¹, Dmitry S. Balabashin²,
Viktoriya A. Toporova^{1,2}, Teymur K. Aliev^{2,3}, Sergey A. Klotchenko¹✉

¹Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia;

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Influenza can cause diseases of varying severity, sometimes leading to hospitalization or death. One of the most promising strategies aimed at reducing morbidity and preventing the risks of severe consequences of infection is the use of broad-spectrum antibodies that provide effective protection against infection with seasonal strains.

The aim of the study was to evaluate the protective activity of CR9114 antibodies of the IgG1 and IgA1 isotypes when administered systemically and locally against experimental influenza infection in mice.

Materials and methods. The recombinant antibodies CR9114 of IgG1 or IgA1 isotypes were administered intranasally to BALB/c mice at a dose of 100 or 20 µg 24 hours before infection with influenza virus A/California/07/09 (H1N1)pdm09 virus at a dose of 10 MLD₅₀ (prophylactic regimen) and/or 24 hours after infection (therapeutic regimen). Body weight dynamics were assessed and mortality was recorded in the animals for 14 days after infection.

Results. Intranasal administration of IgG1 or IgA1 isotype antibodies in the therapeutic-prophylactic regimen led to a decrease in viral load in the respiratory tract tissues of infected mice. At the same time, parenteral administration of IgG (but not IgA) also reduced the virus titer in the nasal passages (but not in the lungs) of mice. It was demonstrated that prophylactic administration of IgG1 or IgA1 antibodies provides complete protection against lethal influenza infection.

Conclusion. Intranasal prophylactic administration of human neutralizing antibodies CR9114 of IgG1 or IgA1 isotypes provides 100% survival of mice in lethal infection with influenza A/California/07/09 (H1N1)pdm09 virus. At the same time, Fc fragments of immunoglobulins of different isotypes, responsible for effector functions, appear to influence the degree of antiviral protection.

Keywords: therapeutic monoclonal antibodies; influenza virus; class G immunoglobulins; class A immunoglobulins; lethal model of influenza infection in mice; evaluation of antibody protective efficacy *in vivo*

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Smorodintsev Research Institute of Influenza (protocol No. 6, April 3, 2025).

Funding source. The study was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation (subject reg. No. NIOKTR in EGISU NIOKTR 124021200034-5).

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Romanovskaya-Romanko E.A., Plotnikova M.A., Oleynik V.A., Shaldzhyan A.A., Monakhova V.S., Balabashin D.S., Toporova V.A., Aliev T.K., Klotchenko S.A. Protective activity of CR9114 universal antibody isotypes against influenza A virus *in vivo*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(6):783–793.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-767>
EDN: <https://www.elibrary.ru/EDEOBG>

Введение

Сезонный грипп — острая респираторная инфекция, провоцируемая вирусами гриппа, которые циркулируют в течение года по всему миру¹. Грипп может вызывать заболевания разной степени тя-

жести, иногда приводящие к госпитализации или смерти. Наиболее перспективными стратегиями, направленными на снижение уровня заболеваемости и предотвращение рисков развития тяжёлых последствий инфекции, являются создание универсальной вакцины или антител (АТ) широкого спектра действия.

¹ ВОЗ. Global Influenza Programme.

URL: <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme>

Известно, что противовирусное действие АТ обусловлено их функциональным строением: уникальный фрагмент Fab (fragment antigen binding), сформированный вариабельными участками АТ, обеспечивает высокоспецифическое связывание вирусного антигена, константная область АТ (Fc) ответственна за эффекторные функции [1, 2]. Несмотря на то что распознавание антигена Fab-фрагментом имеет решающее значение для нейтрализации патогена *in vitro*, становится всё более очевидным, что Fc-опосредованная эффекторная функция играет не менее важную роль в обеспечении защиты *in vivo* [3]. Взаимодействие Fc-фрагментов АТ с рецепторами иммунных клеток (FcR) инициирует ряд провоспалительных, противовоспалительных и адаптивных иммунных реакций хозяина, приводящих к защите, а в некоторых случаях, наоборот, ухудшающих течение заболевания [4]. Эффекторная функция АТ зависит от его класса (IgG, IgA, IgM или IgD), т. е. от способности АТ взаимодействовать с соответствующим ему FcR на поверхности иммунных клеток.

Все клинически одобренные в настоящее время полноразмерные АТ относятся к классу IgG, в том числе благодаря их более длительному периоду полураспада; кроме того, именно для IgG разработаны технологии крупномасштабного производства и очистки [5]. Однако за последние 20 лет были подробно охарактеризованы различные Fc-опосредованные функции не только иммуноглобулинов класса IgG, но и IgA; показаны уникальные эффекторные свойства IgA, что потенциально позволяет разрабатывать более эффективные терапевтические АТ широкого спектра действия на основе этого класса [6].

IgA, наиболее распространённый класс АТ, обнаруживаемых на поверхности слизистых оболочек, играет важную роль в иммунной системе. IgA способны взаимодействовать с различными типами иммунных клеток, экспрессирующих рецептор Fc_αRI (CD89), такими как полиморфноядерные клетки, моноциты, макрофаги и клетки Купфера [7]. Кроме того, IgA могут активировать дендритные или Т-клетки, связываясь с альтернативными клеточными рецепторами, такими как DC-SIGN, рецептор трансферрина или FcRL4 [8].

К настоящему времени выделено и охарактеризовано около десятка АТ широкого спектра действия, большая часть которых нацелена на консервативные участки в стеблевой части поверхностного белка — гемагглютинина, а также несколько АТ, специфически связывающих и блокирующих каталитические центры нейраминидазы вирусов гриппа [9–12].

Настоящее исследование посвящено АТ широкого спектра действия CR9114, специфически связывающему высококонсервативный эпипот в стеблевом домене гемагглютинина и проявляюще-

му перекрёстную реактивность в отношении вирусов гриппа А и В [12]. В 2024 г. было показано, что CR9114 обеспечивает эффективную защиту мышей не только от инфекций, вызванных сезонными штаммами, но и от летальной инфекции, обусловленной штаммом H5N1 с высоким пандемическим потенциалом [13]. На основе известных вариабельных фрагментов CR9114 нами были получены 3 рекомбинантных АТ (рАТ) человека изотипов IgG1, IgA1 и IgA2.

Основной целью настоящего исследования было оценить протективную активность рАТ CR9114 изотипов IgG1 и IgA1 при системном и местном введении в отношении экспериментальной гриппозной инфекции у мышей.

Материалы и методы

Получение и очистка рАТ

На основе последовательностей вариабельных доменов АТ CR9114 (GenBank JX213639.1 и JX213640.1 для тяжёлой и лёгкой цепей соответственно) был проведён дизайн рАТ человека изотипов IgG1, IgA1 и IgA2, различающихся структурой константных доменов тяжёлой цепи. Последовательности константных областей тяжёлых цепей были идентичны представленным в базе данных UniProt [14] последовательностям P01857 (IgG1), P01876 (IgA1) и P01877 (IgA2). Все полученные типы рАТ содержали одинаковую лёгкую цепь каппа-изотипа (константный участок P01834). Сборку антител проводили с использованием биплазмидной системы для экспрессии соответствующей тяжёлой и лёгкой (каппа) цепей АТ в клетках эукариот. В качестве исходного вектора использовали модифицированную плазмиду pcDNA3.4 («Thermo Fisher Scientific»), уже содержащую константные участки цепей АТ, а также универсальные последовательности сигнальных пептидов.

Производство экспериментальных образцов изотипов IgA1 и IgA2, а также контрольного рАТ изотипа IgG1 проводили в клетках СНО в режиме транзиентной экспрессии.

Для получения препаратов рАТ культуральную среду освещали при помощи центрифугирования и проводили очистку белков методом аффинной хроматографии с использованием системы «АКТА pure» («Cytiva») на колонке «КарраШелект» (1 мл; «Cytiva»). Принцип метода очистки белка основан на факте прочного аффинного связывания иммобилизованных на носителе АТ, специфичных к каппа-цепям иммуноглобулинов, с синтезируемыми рАТ изотипов IgG1, IgA1 и IgA2. Элюцию белка с хроматографической колонки осуществляли при низких значениях pH, при которых происходит нарушение аффинных взаимодействий между сорбентом и рекомбинантными иммуноглобулинами.

Эксклюзионная хроматография высокого разрешения

Анализ образцов рАТ проводили методом гель-фильтрационной высокоеффективной жидкостной хроматографии (ГФ-ВЭЖХ). В работе использовали хроматографическую систему «Waters Breeze» («Waters») с управляющим программным обеспечением «Empower 3»; анализ проводили на колонке «Bio-Silic SEC 250-5» («Bio-Rad») размером 7,8 мм × 30 см. В качестве подвижной фазы использовали однократный фосфатно-солевой буфер. Образцы разводили подвижной фазой до конечной концентрации 100 мкг/мл; далее 50 мкл раствора вводили в хроматограф при помощи автосэмплера и элюировали 25 мл подвижной фазы на скорости потока 1 мл/мин. Детекцию осуществляли на длине волны 280 нм в интервале 4–15 мин. Хроматограммы анализировали при помощи «Empower 3».

Лабораторные животные

В работе использованы мыши-самки линии BALB/c массой 19–22 г (Научный центр биомедицинских технологий федерального медико-биологического агентства, филиал «Столбовая»). Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU, санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Все эксперименты с участием лабораторных животных были согласованы с комиссией по биоэтике НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева (протокол № 6 от 03.04.2025).

Иммунизация и заражение животных, забор сывороток и органов

ИнTRANАЗАЛЬНОЕ введение проводили с помощью дозатора под ингаляционным наркозом, вводя препарат в объёме 50 мкл. Внутрибрюшинное введение препаратов осуществляли в объёме 250 мкл с помощью стерильных одноразовых шприцев с размером иглы 30G.

Экспериментальное заражение проводили с помощью дозатора супензии вируса гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 (коллекция НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева), способного вызывать летальную инфекцию у мышей, в дозе 5 или 10 МЛД₅₀ (50% мышиная летальная доза), под эфирным наркозом, в объёме 50 мкл. В течение 14 дней после заражения у животных оценивали динамику массы тела и проводили учёт летальности.

Для лечебно-профилактической схемы исследования препараты рАТ (CR9114_G1 и CR9114_A1) вводили животным в дозе 150 мкг за 4 ч до инфицирования. В качестве контроля возможного неспецифического действия препаратов на основе рАТ был использован коммерческий препарат синагис (100 мг/мл; «AstraZeneca»), гуманизиро-

ванные моноклональные АТ изотипа IgG1, обладающие специфической активностью в отношении респираторно-синцитиального вируса, но не вируса гриппа [15]. Животные группы плацебо получали фосфатно-солевой буфер в эквивалентном объёме. Через 4 ч после введения препаратов животных заражали вирусом гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе 5 МЛД₅₀. Через 24 ч после заражения препараты вводили животным повторно. На 4-й день исследования у животных собирали образцы крови для оценки уровня рАТ, сохраняющихся с момента введения, и органы для определения вирусной нагрузки в тканях нижнего и верхнего респираторного тракта (лёгкие и носовые ходы), а также для оценки уровня рАТ в гомогенатах лёгких.

Для профилактической схемы исследования препараты рАТ (CR9114_G1, CR9114_A1 и CR9114_A2) вводили животным в дозе 100 или 20 мкг за 24 ч до заражения вирусом гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе 10 МЛД₅₀.

Для терапевтической схемы исследования препараты рАТ (CR9114_G1, CR9114_A1 и CR9114_A2) вводили животным в дозе 100 мкг через 24 ч после заражения вирусом гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе 10 МЛД₅₀.

Забор крови для получения сывороток проводили из нижнечелюстной вены. До момента использования сыворотки хранили при -20°C. Забор образцов тканей и органов (лёгких и носовых ходов) проводили у животных после эвтаназии методом цервикальной дислокации. Готовили 10% гомогенаты тканей в фосфатно-солевом буфере с использованием гомогенизатора «TissueLyser II» («Qiagen»), осветляли центрифугированием и хранили при -80°C.

Оценка вирусной нагрузки в гомогенатах органов

Оценку вирусной нагрузки в гомогенатах органов экспериментальных животных проводили методом титрования на культуре клеток MDCK в формате 96-луночного планшета на среде «Альфа-MEM» («Биолот») с добавлением 1% антибиотика-антимикотика («Gibco») и ТРСК-трипсина в конечной концентрации 1 мкг/мл. Инфекционный титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менч-² и выражали как Ig ТИД₅₀/мл (50% тканевая инфекционная доза).

Оценка уровня рАТ в сыворотке крови и гомогенатах тканей

Оценку уровня рАТ в сыворотке крови и гомогенатах тканей выполняли методом иммуноферментного анализа с использованием 96-луночных

² Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Trop. Med. Hygiene*. 1938;27(20):493–7.

иммунологических планшетов «Microlon High Binding» («Greiner Bio-One»). В качестве антигена использовали инактивированный вирус гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 в концентрации 1 мкг/мл. Анализ проводили для 2 разведений сывороток и гомогенатов лёгких (1 : 50, 1 : 100 и 1 : 200, 1 : 500 соответственно). Для выявления IgG использовали коньюгат Goat Anti-Human IgG (H+L), меченный пероксидазой хрена («Bio-Rad»). Для выявления IgA использовали коньюгат Goat Anti-Mouse IgA (α-chain), меченный пероксидазой хрена («Sigma-Aldrich»). Коньюгаты использовали в разведении 1 : 1000. В качестве субстрата применяли тетраметилбензидин («Хема»), цветную реакцию останавливали однонормальной серной кислотой («Вектон»). Оптическую плотность (ОП) измеряли с помощью спектрофотометра «Multiskan SkyHigh» («Thermo Fisher Scientific»). ОП, соответствующую поглощению тетраметилбензидина, вычисляли как разницу ОП_{450 нм} – ОП_{620 нм}.

Реакция микронейтрализации, определение полумаксимальной ингибирующей концентрации

Оценку вируснейтрализующей активности рАТ выполняли на монослойной культуре клеток MDCK методом, описанным ранее [16]. Серии трёхкратных разведений препаратов рАТ смешивали с эквивалентным объёмом ростовой среды, содержащей 100 ТИД₅₀ вируса гриппа, и после 1 ч инкубации при комнатной температуре полученные разведения переносили в планшеты с суточным монослоем клеток MDCK. Планшеты инкубировали в течение 3 сут при 37°C до развития характерного цитопатического действия, развитие которого подтверждало методом реакции гемагглютинации. Нейтрализующим титром считали наибольшее разведение АТ, при котором наблюдалось полное ингибирование цитопатического действия вируса. Полученные значения были трансформированы в процент ингибирования цитопатического действия вируса при определённой концентрации АТ. Полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC₅₀) рассчитывали по результатам построения четырёхпараметрической кривой доза–эффект с использованием программного обеспечения «GraphPad Prism v. 9.5.1» на основании 3 независимых повторов.

Первичные данные и статистическая обработка

Статистический анализ первичных данных проводили в программных пакетах «Microsoft Office Excel 2010» и «GraphPad Prism v. 9.5.1». Для представления данных использовали следующие статистические показатели: среднее арифметическое, стандартное отклонение, стандартная ошибка среднего. Для определения значимости разли-

чий между групповыми средними использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA для группового сравнения или его непараметрический аналог — критерий Краскела–Уоллиса, затем, в случае если нулевая гипотеза отвергается, — критерий Тьюки или непараметрический критерий Данна для апостериорных попарных сравнений с группой плацебо. Для сравнения кривых выживаемости использовали непараметрический логранговый критерий. Априорный уровень значимости принимали равным $\alpha = 0,05$. Различия считали достоверными при достигнутом уровне значимости $p < \alpha$.

Результаты

Получение рАТ CR9114 различных изотипов

На основе вариабельных последовательностей рАТ CR9114 [12] были созданы генетические конструкции для накопления человеческих рАТ изотипов IgG1, IgA1 и IgA2 в эукариотических клеточных линиях.

Методом транзиентной экспрессии были получены экспериментальные образцы рАТ изотипов IgG1, IgA1 и IgA2. Анализ образцов методом эксклюзивной хроматографии показал, что время удержания пика основного вещества в образцах рАТ IgA1- и IgA2-изотипов равно 7,5–7,8 мин, IgG1 — 8,3 мин (рис. 1, а). Данные значения, согласно калибровочному графику колонки, соответствуют мономерным формам IgA (~ 160 кДа) и IgG (~ 150 кДа). Согласно полученным результатам препараты рАТ почти не содержали нежелательных агрегатов и удовлетворяли требуемым критериям чистоты.

Для подтверждения противовирусного действия сконструированных рАТ CR9114 в формате IgG1 (CR9114_G1) и в формате IgA1 (CR9114_A1) была оценена их нейтрализующая активность *in vitro* в отношении вируса гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09. IC₅₀ для рАТ CR9114_G1 составила 0,06152 мкг/мл, для рАТ CR9114_A1 — 0,3133 мкг/мл (рис. 1, б). Показатели специфической активности рАТ различных изотипов были сопоставимы, и на следующем этапе полученные экспериментальные препараты рАТ были использованы для оценки защитной эффективности в отношении гриппозной инфекции у мышей.

Влияние способа введения на специфическую активность рАТ CR9114 в отношении вируса гриппа А

На первом этапе для изучения специфической активности рАТ оценивали защитную эффективность экспериментальных препаратов в отношении гриппозной инфекции у мышей при введении по лечебно-профилактической схеме. Для этого животным за 4 ч до инфицирования вирусом гриппа

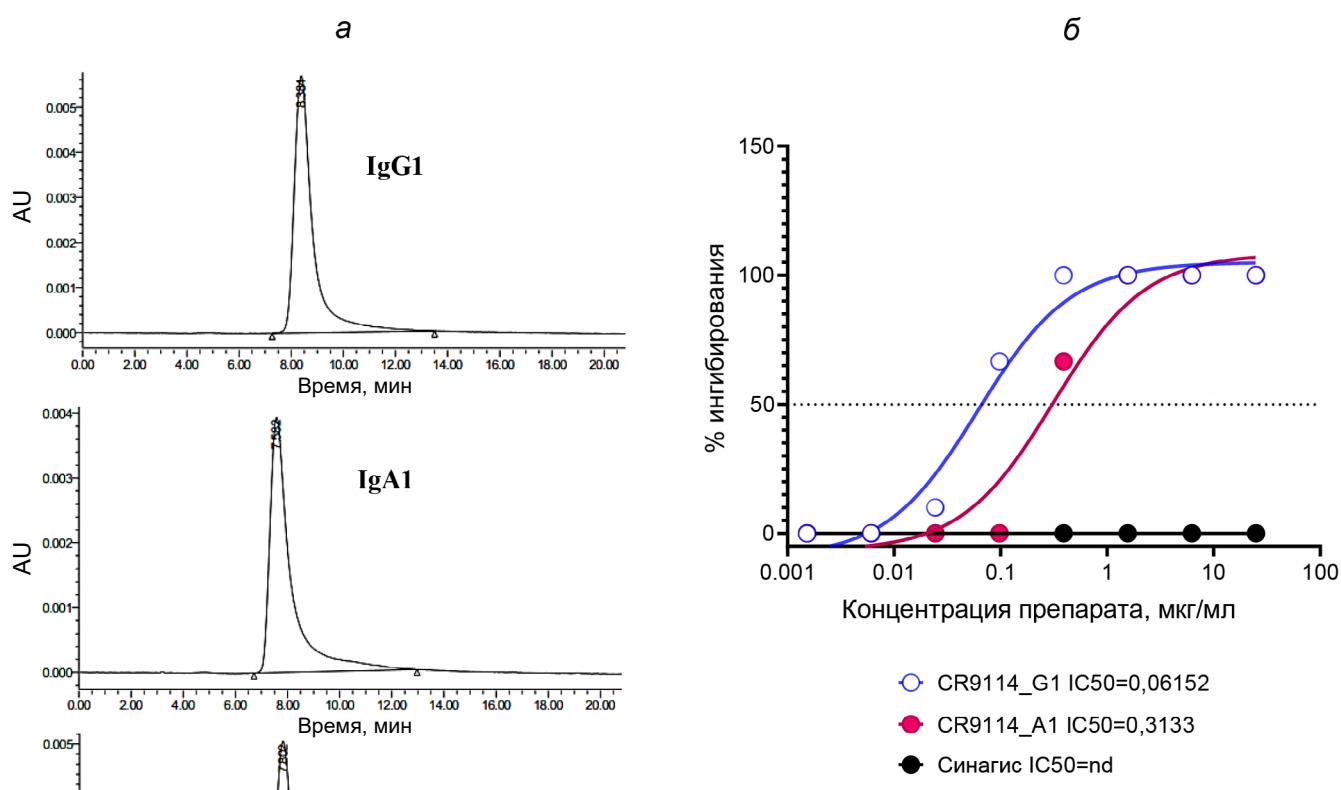


Рис. 1. Анализ препаратов рАТ CR9114 изотипов IgG1, IgA1 и IgA2.

а — хроматограммы ГФ-ВЭЖХ очищенных препаратов CR9114 разных изотипов (по оси абсцисс — время в минутах, на изображениях видны пики элюции); б — нейтрализующая активность рАТ CR9114 в отношении вируса гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 *in vitro*. Определение нейтрализующей активности было выполнено в 3 независимых повторах, для каждой точки на графике представлено среднее значение нормализованного процента ингибирования \pm стандартное отклонение.

А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 вводили препараты рАТ CR9114 в формате IgG1 (CR9114_G1) или IgA1 (CR9114_A1) в дозе 150 мкг. Через 24 ч после заражения препараты вводили животным повторно. В исследовании были протестированы два способа введения рАТ: интраназальное и парентеральное (внутрибрюшинное).

Полученные данные показали, что интраназальное введение рАТ изотипов IgG1 и IgA1 приводит к достоверному снижению вирусной нагрузки в тканях верхнего и нижнего респираторного тракта (рис. 2, а). По сравнению с группой контроля заражения титр инфекционного вируса снижался более чем на 5 лг, вплоть до полной элиминации патогена ($p < 0,0001$). При этом внутрибрюшинное введение рАТ, вне зависимости от изотипа, не приводило к выраженному снижению титра инфекционного вируса в респираторном тракте заражённых животных ($p > 0,5$). Неспецифического защитного действия для препарата синагис в отношении гриппозной инфекции показано не было.

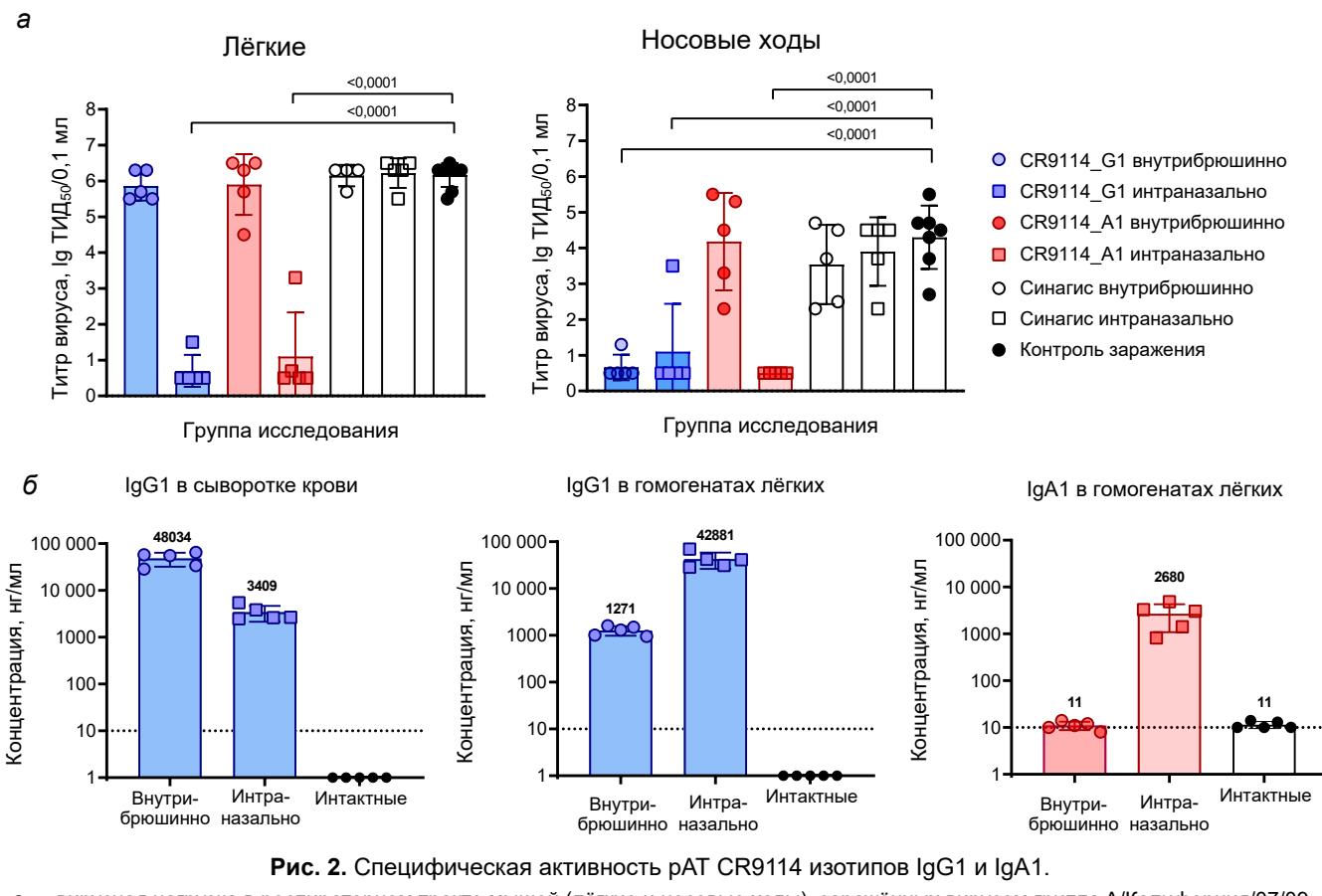
Оценка уровня рАТ в сыворотке крови показала, что рАТ изотипа IgG1 проникают в систем-

ный кровоток вне зависимости от способа введения препарата и сохраняются до 4 сут на высоком уровне (3,4–48,0 мкг/мл). При внутрибрюшинном введении по сравнению с интраназальным уровень остаточных рАТ в сыворотке крови животных был достоверно выше ($p < 0,05$), тогда как в тканях лёгких уровень рАТ был достоверно выше при интраназальном введении (рис. 2, б).

Выявить рАТ изотипа IgA1 в сыворотке крови экспериментальных животных на 4-е сутки после введения не удалось ни при одном из способов введения экспериментальных препаратов (данные не представлены). В тканях респираторного тракта (в лёгких) рАТ изотипа IgA1 были выявлены только при интраназальном введении, их концентрация составила 2,7 мкг/мл.

Интраназальное введение рАТ CR9114 обеспечивает защиту мышей от летальной гриппозной инфекции

Эффективность интраназального введения рАТ для пассивной иммунотерапии гриппозной инфекции у мышей, подтверждённая в предыдущем



разделе, определила выбор данного пути введения для последующих экспериментов по оценке протективной активности.

На следующем этапе была оценена защитная эффективность препаратов рАТ изотипов IgG1 (CR9114_G1), IgA1 (CR9114_A1) и IgA2 (CR9114_A2) в режиме однократного введения при профилактическом (с эскалацией дозы) или терапевтическом использовании. Экспериментальные препараты рАТ вводили животным за 24 ч до заражения или через 24 ч после заражения. Летальную инфекцию моделировали с использованием вируса гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 в дозе 10 МЛД₅₀. В течение 14 дней после заражения у животных оценивали динамику массы тела и проводили учёт летальности.

Показано, что однократное профилактическое применение рАТ CR9114_G1 и CR9114_A1 в дозе 100 мкг обеспечивает полную защиту от летальной инфекции, выживаемость в этих группах животных была 100%, а динамика массы тела не отличалась от показателей интактной группы. Показатели защиты в группе животных, получавших

рАТ CR9114_A2 в дозе 100 мкг, были ниже: выживаемость составляла 80%, а масса тела была достоверно ниже, чем у интактных животных, начиная с 7-х суток наблюдения ($p < 0,05$). При использовании низкой дозы рАТ (20 мкг) было показано снижение защитного действия для всех 3 тестируемых препаратов. Так, выживаемость в группе мышей, получавших рАТ CR9114_G1, составила 80%, в группе CR9114_A1 — 60%, в группе CR9114_A2 — 50% (рис. 3, а).

Однократное терапевтическое применение всех 3 препаратов рАТ в дозе 100 мкг не обеспечивало защиту от летального заражения в полном объёме. У всех животных в этих группах наблюдалось снижение массы тела по сравнению с незаражёнными животными. Выживаемость в группах животных, получавших рАТ только после заражения, составила 50% для препаратов CR9114_G1 и CR9114_A2 и 20% для CR9114_A1 (рис. 3, б).

Таким образом, рАТ изотипов IgG1 и IgA1 продемонстрировали сопоставимую защитную эффективность. В то же время эффективность рАТ изотипа IgA2 была значимо ниже, чем у IgA1.

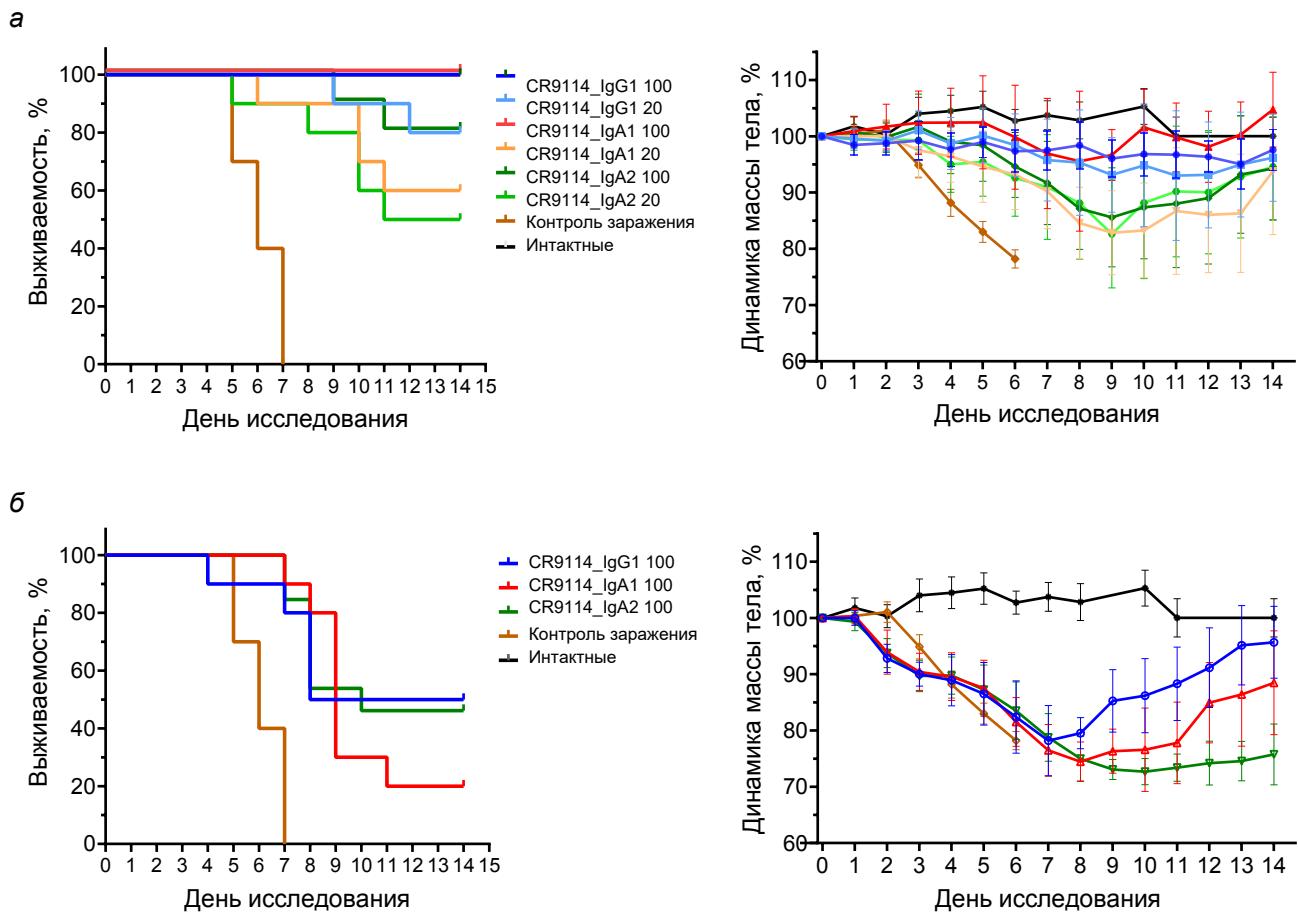


Рис. 3. Кривые выживаемости Каплана–Мейера и динамика массы тела мышей, получавших рАТ CR9114 однократно по профилактической (а) или лечебной (б) схеме.

Экспериментальное заражение вирусом гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09 (10 МЛД₅₀), 10 животных в группе. Показаны кривые выживаемости и динамика массы тела относительно 0-го дня для групп животных, получавших рАТ CR9114 IgG1-изотипа (CR9114_G1), IgA1-изотипа (CR9114_A1) и IgA2-изотипа (CR9114_A2) за 1 сут до заражения в дозах 100 и 20 мкг или через 1 сут после заражения в дозе 100 мкг.

Обсуждение

Как было показано ранее, рАТ CR9114 связывается со стеблевым доменом гемагглютинина и демонстрирует перекрёстную защиту в отношении инфекции, вызванной вирусами гриппа А и В [12, 13]. Таким образом, рАТ CR9114 обладает высоким терапевтическим потенциалом для защиты не только от сезонных вирусов гриппа, но и от вновь появляющихся зоонозных штаммов [17].

Поскольку входными воротами для вируса гриппа являются верхние дыхательные пути, иммунная система слизистых оболочек играет центральную роль в противовирусной защите. Распределение иммуноглобулинов на слизистой оболочке и в сыворотке крови различается. На слизистой оболочке преобладающим классом АТ являются IgA (~ 74% всех иммуноглобулинов слизистой оболочки), за которыми следуют IgG (~ 25%) и IgM (~ 2%) [18]. При этом в сыворотке крови преобладающим классом является IgG (75–80% сывороточных иммуноглобулинов), за ним следуют IgA (15%) и

IgM (10%) [8]. Общая продукция у IgA (40–60 мг/кг в день) выше, чем у всех других классов АТ вместе взятых [8]. Таким образом, сравнительный анализ эффективности АТ CR9114 различных классов в качестве средства пассивной иммунотерапии является логичным и обоснованным.

Ранее было установлено, что при разных способах введения рАТ CR9114 могут обеспечивать Fc-зависимый или Fc-независимый механизм защиты [19]. В частности, A.L. Beukenhorst и соавт. сравнивали защитную эффективность рАТ CR9114 в формате полноразмерного IgG1, IgG1 с Fc-дефектной функцией и в формате F(ab')₂ [19].

В нашей работе основное внимание было уделено исследованию протективной активности рАТ CR9114 в зависимости от различных эфекторных функций, опосредованных Fc-фрагментами разных изотипов. Были разработаны и получены 3 человеческих рАТ на основе вариабельных областей АТ CR9114 [12]: одно — изотипа IgG1 и два — изотипов IgA1 и IgA2 в мономерной фор-

ме. Эффекторная роль IgG осуществляется за счёт связывания с рецепторами класса Fc γ R (I, II, III), а IgA — за счёт связывания с Fc α RI/CD89 [20]. Структурным отличием изотипов IgA1 и IgA2 является длина гибкой шарнирной области, которая разделяет антигенсвязывающую и эффекторную части АТ. IgA1 имеют шарнирную область, состоящую из 22 аминокислот, которая содержит до 5 О-связанных гликанов по остаткам серина и треонина. Напротив, IgA2 имеют шарнир из 9 аминокислот и лишены О-связанных гликанов [21].

На первом этапе исследования была подтверждена высокая степень чистоты и целостности целевых рАТ во всех препаратах, что позволило перейти к экспериментам на лабораторных животных. Для полученных препаратов рАТ на клеточной модели гриппозной инфекции была определена IC₅₀. Стоит отметить, что значение IC₅₀ для рАТ CR9114 изотипа IgG1 оказалось приблизительно в 5 раз ниже, чем для изотипа IgA1. Одним из возможных объяснений этому может служить различие в сегментарной гибкости изотипов, которое влияет на доступность антигенсвязывающих участков.

Защитную эффективность препаратов рАТ оценивали на мышной модели гриппозной инфекции при парентеральном и интраназальном введении. Было показано, что интраназальное введение рАТ изотипов IgG1 и IgA1 обеспечивает снижение вирусной нагрузки в тканях респираторного тракта инфицированных мышей и полностью подавляет репликацию патогена. При этом парентеральное введение IgG1 (но не IgA1) обеспечивало также снижение титра вируса в носовых ходах (но не в лёгких) мышей.

В доклинических исследованиях иногда используют рАТ с видоспецифическими константными областями для предотвращения иммуногенности или проводят эксперименты на гуманизированных трансгенных мышах линии Tg32, экспрессирующих человеческий неонатальный Fc-рецептор (hFcRn). IgG1 человека имеют высокое функциональное сходство с мышными IgG2a с точки зрения фармакокинетики и Fc-опосредованной эффекторной функции [22]. Напротив, гомологов IgA1 и Fc α RI человека, по современным экспериментальным данным, у мышей нет [4].

В зависимости от изотипа (IgG1 или IgA1) в нашем исследовании было показано различное распределение рАТ в респираторном тракте и системном кровотоке экспериментальных животных. Вероятно, выявленные различия в распределении рАТ в сыворотке и их противовирусной активности связаны со степенью гомологии человеческих АТ (и их рецепторов) с мышными аналогами.

В мышных моделях пассивная иммунизация против гриппа обычно проводится путём периферической системной инъекции [9, 22]. В нашей работе

показано преимущество локального интраназального введения над системным парентеральным введением, вероятно, обусловленное созданием терапевтической концентрации рАТ непосредственно на слизистой дыхательных путей — первичном очаге инфекции. Меньшая инвазивность и прицельная доставка подтверждают перспективность разработки интраназальных препаратов для профилактики и терапии гриппа.

Таким образом, для оценки дозозависимого противовирусного действия рАТ было использовано только интраназальное введение. Полученные нами результаты в целом подтверждают выводы недавно опубликованного исследования [19] о том, что интраназальное введение рАТ CR9114 является более эффективным, если оно содержит Fc-домен, хотя относительный вклад Fc-фрагмента при интраназальном введении ниже, чем при парентеральном.

В нашей работе показано, что лечение рАТ CR9114 в формате IgG1, IgA1 или IgA2 не приводило к эффективной защите животных от летальной инфекции. Профилактическое введение IgG1 или IgA1 в дозе 100 мкг обеспечивало 100% выживаемость животных при летальной инфекции вирусом гриппа А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09.

Заключение

Проведённое исследование демонстрирует, что интраназальное профилактическое введение человеческих нейтрализующих рАТ CR9114 изотипов IgG1 или IgA1 обеспечивает 100% противовирусную защиту от летальной инфекции вирусом гриппа у мышей. При этом Fc-фрагменты иммуноглобулинов разных изотипов, отвечающие за эффекторные функции, по-видимому, могут влиять на степень выраженности противовирусной защиты.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Bates A., Power C.A. David vs. Goliath: The structure, function, and clinical prospects of antibody fragments. *Antibodies*. 2019;8(2):28. DOI: <https://doi.org/10.3390/antib8020028>
2. Klasse P.J. Neutralization of virus infectivity by antibodies: old problems in new perspectives. *Adv. Biol.* 2014;2014:1–24. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/157895>
3. Dilillo D.J., Tan G.S., Palese P., Ravetch J.V. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcR interactions for protection against influenza virus *in vivo*. *Nat. Med.* 2014;20(2):143–51. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.3443>
4. Ben Mkaddem S., Benhamou M., Monteiro R.C. Understanding Fc receptor involvement in inflammatory diseases: from mechanisms to new therapeutic tools. *Front. Immunol.* 2019;10:811. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00811>
5. Клотченко С.А., Романовская-Романко Е.А., Плотникова М.А. и др. Разработка и исследование вируснейтрализующей активности рекомбинантного человеческого антитела к F-гликопротеину респираторно-синцитиального вируса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(6):735–47. Klotchenko S.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Plotnikova M.A., et al. Development and evaluation of a recombinant monoclonal human antibody

- with virus-neutralizing activity against the F glycoprotein of respiratory syncytial virus. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(6):735–47. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-611> EDN: <https://elibrary.ru/zkqvtw>
6. Cottignies-Calamar A., Tudor D., Bomsel M. Antibody Fc-chimerism and effector functions: When IgG takes advantage of IgA. *Front. Immunol.* 2023;14:1037033. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1037033>
7. Li B., Xu L., Tao F., et al. Simultaneous exposure to Fc γ R and Fc α R on monocytes and macrophages enhances antitumor activity *in vivo*. *Oncotarget*. 2017;8(24):39356–66. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17000>
8. Bohländer F. A new hope? Possibilities of therapeutic IgA antibodies in the treatment of inflammatory lung diseases. *Front. Immunol.* 2023;14:1127339. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1127339>
9. Corti D., Agatic G., Bianchi S., et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science*. 2011;333(6044):850–6. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1205669>
10. Momont C., Dang H.V., Zatta F., et al. A pan-influenza antibody inhibiting neuraminidase via receptor mimicry. *Nature*. 2023;618(7965):590–7. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06136-y>
11. Biswas M., Yamazaki T., Chiba J., Akashi-Takamura S. Broadly neutralizing antibodies for influenza: passive immunotherapy and intranasal vaccination. *Vaccines*. 2020;8(3):424. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines8030424>
12. Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., et al. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science*. 2012;337(6100):1343–8. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1222908>
13. Beukenhorst A.L., Frallicciardi J., Rice K.L., et al. A pan-influenza monoclonal antibody neutralizes H5 strains and prophylactically protects through intranasal administration. *Sci. Rep.* 2024;14(1):3818. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53049-5>
14. Bairoch A., Apweiler R., Wu C.H., et al. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D154–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gki070>
15. Johnson S., Oliver C., Prince G.A., et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent *in vitro* and *in vivo* activity against respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 1997;176(5):1215–24. DOI: <https://doi.org/10.1086/514115>
16. Кривицкая В.З., Петрова Е.Р., Сорокин Е.В. и др. Получение и характеристика моноклональных антител, специфичных к респираторно-синцитиальному вирусу. *Биотехнология*. 2016;32(1):65–75. Krivitskaya V.Z., Petrova E.R., Sorokin E.V., et al. Design and characteristics of monoclonal antibodies specific to respiratory syncytial virus. *Biotechnology*. 2016;32(1):65–75. EDN: <https://elibrary.ru/vvzks>
17. Ларинова Н.В., Киселева И.В., Баженова Е.А. и др. Влияние биологических свойств сезонных вирусов гриппа на эффективность подготовки штаммов живой гриппозной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;(5):24–34. Larionova N.V., Kiseleva I.V., Bazhenova E.A., et al. The influence of seasonal influenza viruses biological features on the effectiveness of development strains for live influenza vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;(5):24–34. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-24-34> EDN: <https://elibrary.ru/rucdbf>
18. de Sousa-Pereira P., Woof J.M. IgA: structure, function, and developability. *Antibodies (Basel)*. 2019;8(4):57. DOI: <https://doi.org/10.3390/antib8040057>
19. Beukenhorst A.L., Rice K.L., Frallicciardi J., et al. Intranasal administration of a panreactive influenza antibody reveals Fc-independent mode of protection. *Sci. Rep.* 2025;15(1):10309. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-94314-5>
20. Schroeder H.W., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012;125(202):S41–52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
21. Maurer M.A., Meyer L., Bianchi M., et al. Glycosylation of human IgA directly inhibits influenza A and other sialic-acid-binding viruses. *Cell Rep.* 2018;23(1):90–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.027>
22. Lo M., Kim H.S., Tong R.K., et al. Effector-attenuating substitutions that maintain antibody stability and reduce toxicity in mice. *J. Biol. Chem.* 2017;292(9):3900–8. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.767749>
23. Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J., et al. Structure and function analysis of an antibody recognizing all influenza A subtypes. *Cell*. 2016;166(3):596–608. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.073>

Информация об авторах

Романовская-Романко Екатерина Андреевна — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. векторных вакцин НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, romromka@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7560-398X>

Плотникова Марина Александровна — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. векторных вакцин НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, biomalinka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8196-3156>

Олейник Вероника Андреевна — лаборант-исследователь лаб. иммунобиологических технологий НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, working.lyutik@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0005-3081-0463>

Шалджян Арам Арутюнович — лаборант-исследователь лаб. генной инженерии и экспрессии рекомбинантных белков НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, shaldzhyan@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8646-6252>

Монахова Варвара Сергеевна — канд. биол. наук, в. н. с. лаб. иммунобиологических технологий НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, varvara.bio@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0002-9519-5316>

Балабашин Дмитрий Сергеевич — канд. биол. наук, м. н. с. лаб. инженерии белка Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия, dbalabashin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7627-0600>

Information about the authors

Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of Vector Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, romromka@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7560-398X>

Marina A. Plotnikova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of Vector Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, biomalinka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8196-3156>

Veronika A. Oleynik — laboratory researcher, Laboratory of immunobiological technologies, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, working.lyutik@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0005-3081-0463>

Aram A. Shaldzhyan — laboratory researcher, Laboratory of genetic engineering and recombinant protein expression, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, shaldzhyan@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8646-6252>

Varvara S. Monakhova — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of immunobiological technologies, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, varvara.bio@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0002-9519-5316>

Dmitry S. Balabashin — Cand. Sci. (Biol.), junior researcher, Laboratory of protein engineering, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia, dbalabashin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7627-0600>

Торопрова Виктория Александровна — лаборант-исследователь лаб. иммунобиологических технологий НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия; н. с. лаб. инженерии белка Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия, toporova.viktorija@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7450-7096>

Алиев Теймур Кантамирович — канд. хим. наук, зам. рук. Центра компетенций Национальной технологической инициативы Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия; н. с. каф. химической энзимологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, ta12345@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1753-9614>

Клотченко Сергей Анатольевич — канд. биол. наук, зав. лаб. иммунобиологических технологий НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия, fosfatik@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0289-6560>

Участие авторов: Романовская-Романко Е.А. — подготовка и проведение экспериментов, обработка и анализ данных, визуализация, написание и редактирование текста рукописи; Плотникова М.А. — подготовка и проведение экспериментов, обработка и анализ данных, визуализация, написание и редактирование текста рукописи; Олейник В.А. — проведение экспериментов, обработка и анализ данных; Шалджян А.А. — проведение хроматографической очистки, визуализация; Монахова В.С. — проведение экспериментов, обработка и анализ данных; Балабашин Д.С. — получение рекомбинантных антител; Торопрова В.А. — получение генно-инженерных конструкций; Алиев Т.К. — концептуализация, редактирование текста рукописи; Клотченко С.А. — концептуализация, общее руководство проектом, привлечение финансирования, рецензирование и редактирование текста рукописи, окончательное утверждение версии для публикации. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 20.10.2025;
принята к публикации 21.12.2025;
опубликована 28.12.2025

Viktoriya A. Toporova — laboratory researcher, Laboratory of immunobiological technologies, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia; researcher, Laboratory of protein engineering, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia, toporova.viktorija@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7450-7096>

Teymur K. Aliev — Cand. Sci. (Chem.), Deputy Head, Competence Center of the National Technological Initiative, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia; researcher, Department of chemical enzymology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, ta12345@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1753-9614>

Sergey A. Klotchenko — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of immunobiological technologies, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia, fosfatik@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0289-6560>

Authors' contributions: Romanovskaya-Romanko E.A. — preparation and conduct of experiments, data processing and analysis, visualization, writing and editing the manuscript; Plotnikova M.A. — preparation and conduct of experiments, data processing and analysis, visualization, writing and editing the manuscript; Oleynik V.A. — conducting experiments, data processing and analysis; Shalzhyan A.A. — performing chromatographic purification, visualization; Monakhova V.S. — conducting experiments, data processing and analysis; Balabashin D.S. — production of recombinant antibodies; Toporova V.A. — production of genetically engineered constructs; Aliev T.K. — conceptualization, editing the manuscript; Klotchenko S.A. — conceptualization, general management of the project, raising funds, reviewing and editing the manuscript, final approval of the version for publication. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 20.10.2025;
accepted for publication 21.12.2025;
published 28.12.2025