

## Изотермические методы амплификации

### Содержание

Введение

1. Технология изотермической амплификации
2. Описание продукции
3. Мировой рынок
4. Основные игроки на рынке и готовые продукты
5. Исследования и разработки

### Введение

Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот являются важной модификацией классической ПЦР-технологии, её развитием в сторону более широкого спектра приложений, где молекулярная диагностика занимает ключевую позицию. Согласно общеотраслевым прогнозам, растущий рынок молекулярной диагностики в составе технологии лаборатории-на-чипе, ПЦР в реальном времени и мультиплексной ПЦР, а также NGS- секвенирования легко может переварить многие из новейших технологий амплификации. Тем не менее, устройствам на базе изотермических реакций придётся конкурировать как с существующими, получившими широкое распространение ПЦР-технологиями, так и с иммунохимическими тест-полосками на рынке простых качественных решений для широкого круга задач.

### 1. Технология изотермической амплификации

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) представляет собой хорошо известный подход для амплификации определенной последовательности нуклеиновой кислоты. Классическая ПЦР предполагает циклическое изменение температуры реакционного коктейля для достижения эффекта амплификации. Помимо классической ПЦР, существуют другие методы амплификации, которые часто не требуют изменения температуры реакции и поэтому называются изотермическим.

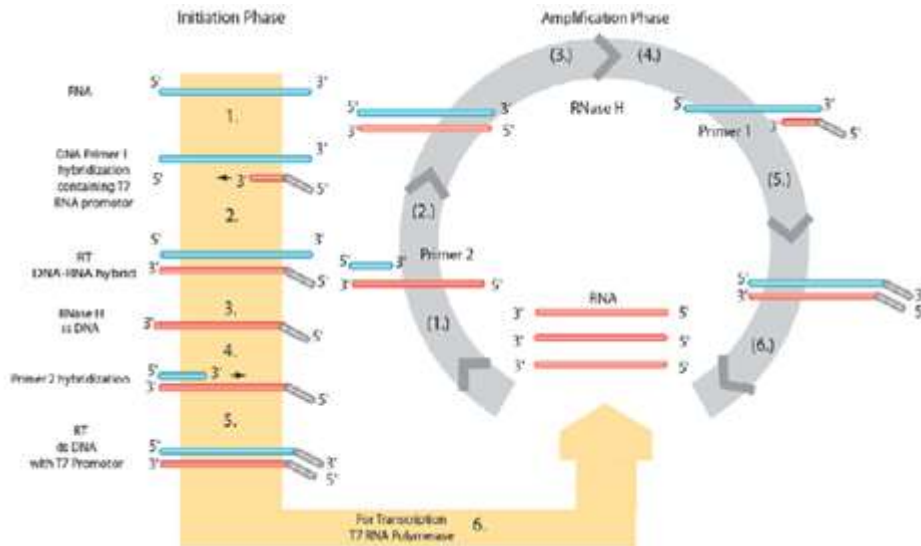
### Основные модификации технологии изотермической амплификации<sup>1</sup>

- *Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)*

---

<sup>1</sup> Деление использовано в отчёте: «Isothermal Nucleic Acid Amplification Market: By Technology (Revenue, USD Million, 2014 - 2025)»

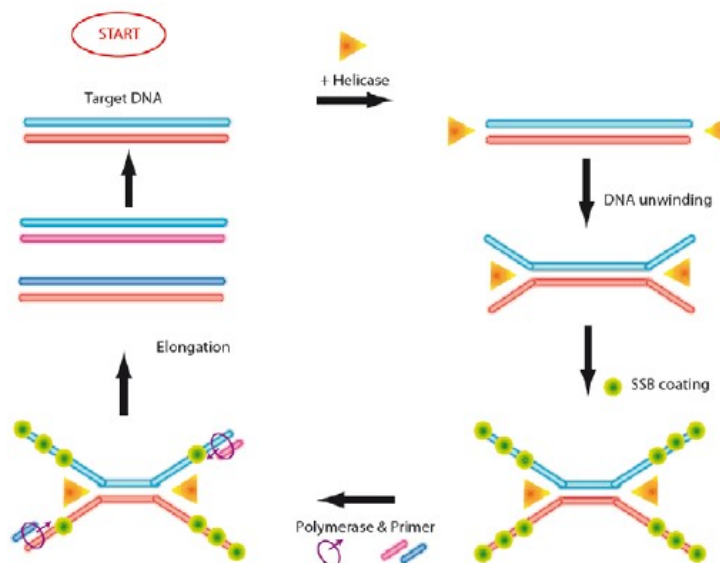
Детекция РНК-мишеней. Тот же механизм, что ТМА, но есть третий фермент – РНКаза. Фаза инициации: 1) отжиг ДНК-праймеров на РНК-мишени, 2) удлинение праймеров обратной транскриптазой, 3) РНКаза H удаляет РНК-мишень, 4) отжиг праймера 2 на ДНК-мишени, 5) удлинение цепи полимеразой с ОТ-активностью, 6) T7-РНК-полимераза продуцирует РНК-транскрипты. Фаза амплификации: пункты 1-6 фазы инициации. Схема представлена на рисунке.



**Рисунок.** Схема амплификации NASBA.

– *helicase-dependent amplification (HDA)*

Выглядит как обычная репликация ДНК. Два способа: либо используются белки для поддержания одноцепочечной конформации, либо термостабильные ДНК-полимеразы (Gst-полимеразы). Хеликаза используется для исходного рассоединения комплементарных цепей. Схема реакции представлена на рисунке. Метод запатентован NEB (Таблица).



**Рисунок.** Схема HDA

**Таблица. Патенты, описывающие технологию HDA**

Название патента\ авторы	Номер	Приоритет	Владелец
Helicase dependent amplification of nucleic acids\ Huimin Kong, Myriam Vincent, Yan Xu	US7282328B2	16 октября 2007	BIOHELIX CORP (New England Biolabs Inc)
Helicase-dependent amplification of RNA\ Huimin Kong, Myriam Vincent, Yan Xu	US7662594B2	16 февраля 2010	BIOHELIX CORP (New England Biolabs Inc)

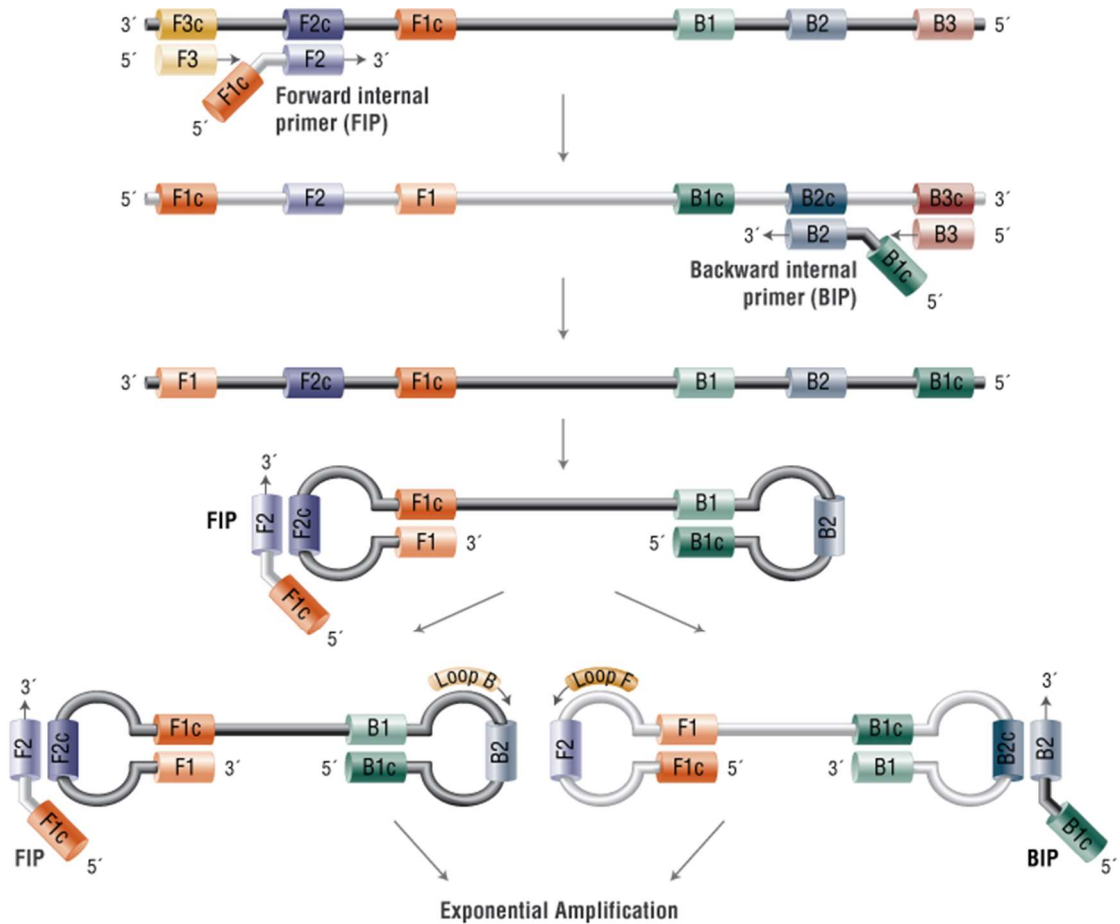
– *loop-mediated amplification (LAMP)*<sup>2</sup>

Основа реакции ПЦР по технологии LAMP: 2 праймера для таргетного региона + 2 праймера для синтеза шпилечных конструкций. Специальная лишённая экзонуклеазной активности ДНК-полимераза (обычно Bst) вытесняет во время синтеза старую цепь. Образующиеся шпильки используются как затравки для дальнейшего синтеза цепи. Схема технологии представлена на рисунке.

**Таблица. Патенты, описывающие технологию LAMP**

Название патента\ авторы	Номер	Приоритет	Владелец
Stable reagents and kits useful in loop-mediated isothermal amplification (LAMP)\ Todd Denison, Pack Xiaokang Deng	US20080182312 A1	17 января 2007	Meridian Bioscience Inc
	WO 00/28082, WO 01/34790, WO 01/77317		Eiken Chemical Co. Ltd.

<sup>2</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lggw>



**Рисунок.** Технология LAMP<sup>3</sup>

– *strand displacement amplification (SDA)*<sup>4</sup>

Наряду с обычными праймерами используются мега-праймеры, которые вытесняют старую цепь при синтезе дочерней. Также задействованы экзонуклеазы рестрикции, которые генерируют сайты для ДНК-полимераз непосредственно на матрице без использования праймеров. Схема технологии представлена на рисунке.

<sup>3</sup> <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification>

<sup>4</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=j8YxNBw2CiM>

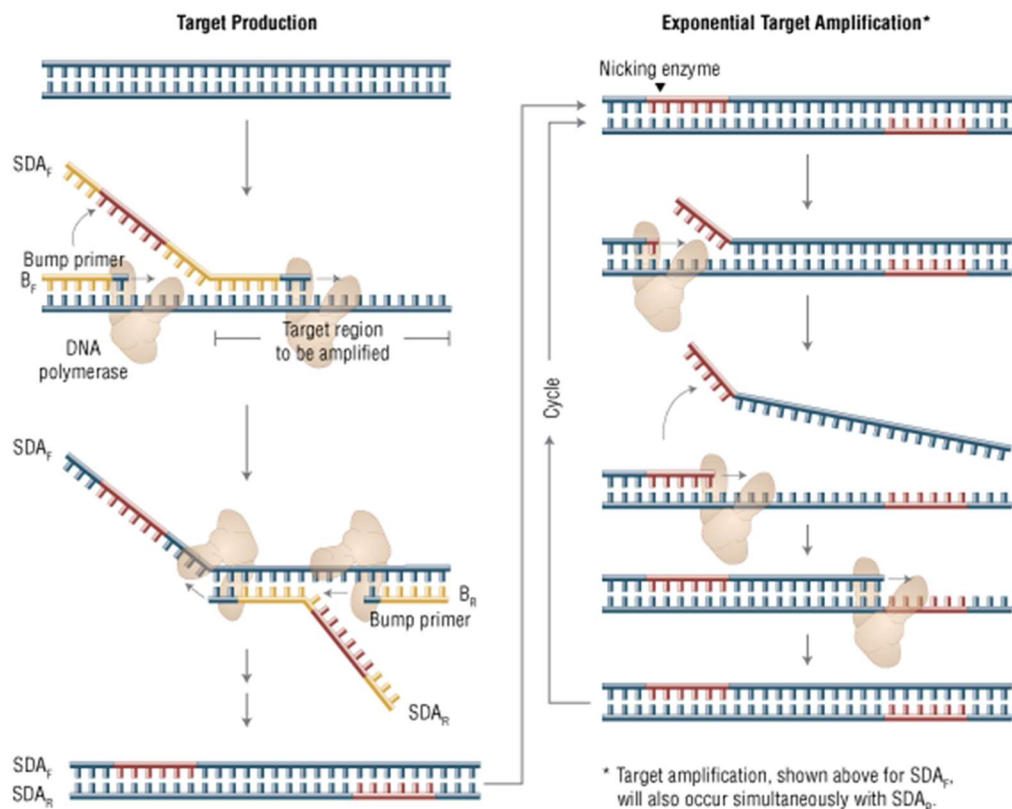


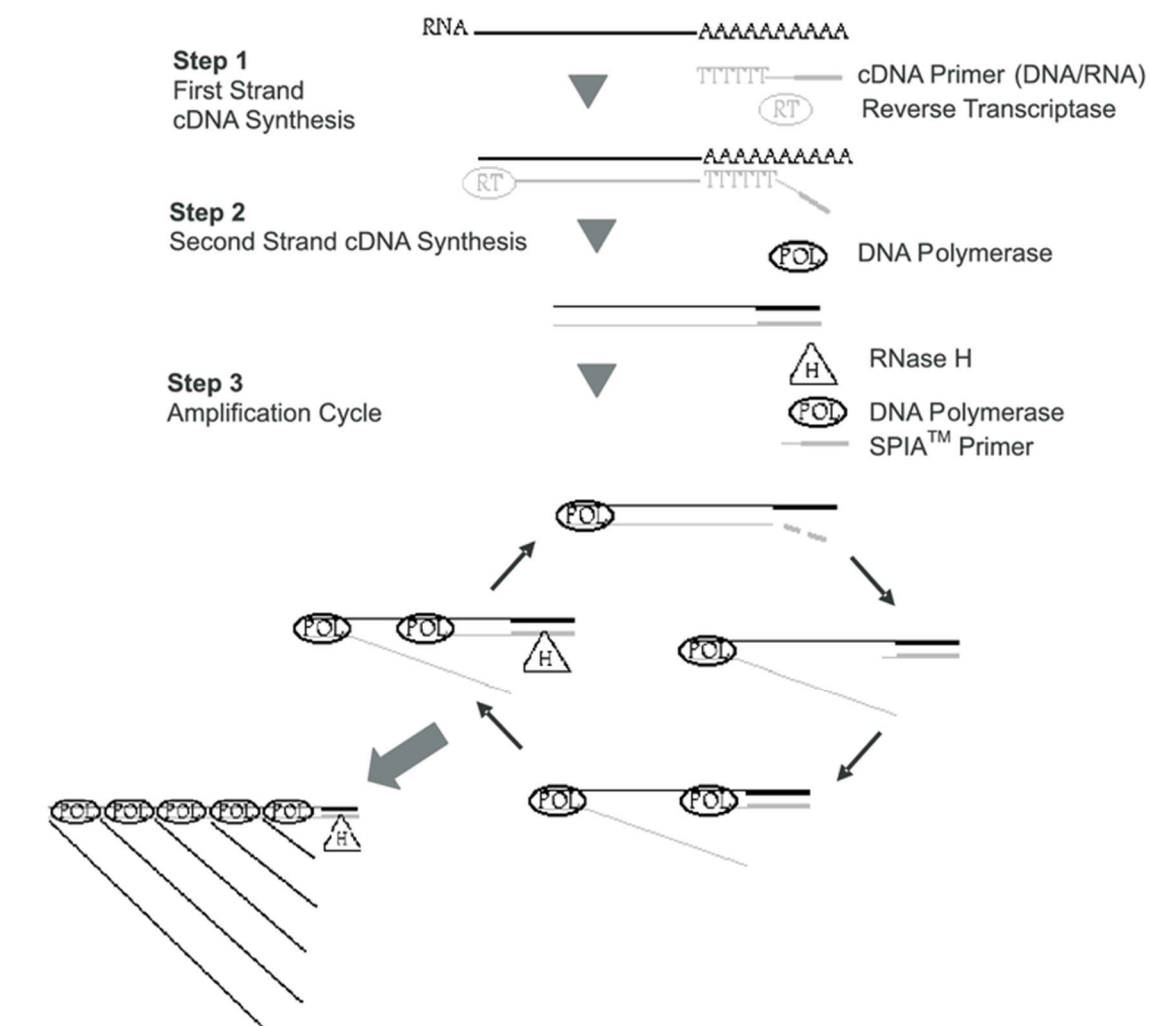
Рисунок. Технология SDA<sup>5</sup>

– *Single Primer Isothermal Amplification (SPIA)*

SPIA для амплификации ДНК использует единственный химерный праймер, состоящий из рибонуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов, ДНК-полимеразы и РНКазы H. *Ribo-SPIA* используется для амплификации РНК, особенно линейных мРНК. Метод SPIA применяют для амплификации широкого спектра нуклеиновых кислот из малых по объёму материала биологических образцов<sup>6</sup>. Схема технологии представлена на рисунке.

<sup>5</sup> [https://international.neb.com/-/media/nebus/page-images/applications/dna-amplification-and-pcr/sda\\_workflow.png?la=en&hash=E3FD14638033CB1F4E34EED46CF73A08D387B01D](https://international.neb.com/-/media/nebus/page-images/applications/dna-amplification-and-pcr/sda_workflow.png?la=en&hash=E3FD14638033CB1F4E34EED46CF73A08D387B01D)

<sup>6</sup> <https://www.omicsonline.org/open-access/isothermal-nucleic-acid-amplification-system-an-update-on-methods-and-applications.pdf>



**Рисунок.** Схема технологии SPIA

**Таблица.** Патенты, описывающие технологию SPIA

Название патента\ авторы	Номер	Приоритет	Владелец
Methods, kits and compositions for single primer linear isothermal amplification of nucleic acid sequences\ Nurith Kurn	US7771946B2	09 февраля 2001	Nugen Technologies Inc
Isothermal Nucleic Acid Amplification Methods and Compositions\ Nurith Kurn Shenglong Wang	US20090203085A1	12 февраля 2008	Nugen Technologies Inc
Single primer isothermal nucleic acid amplification-enhanced analyte detection and quantification	US20040023271A1	29 марта 2002	Nugen Technologies Inc

– *nicking enzyme amplification reaction (NEAR)*

Метод использует вытесняющую цепочку ДНК-полимеразу, иницирующуюся на насечке, создаваемой никазой (nicking enzyme), быстро продуцируя много коротких

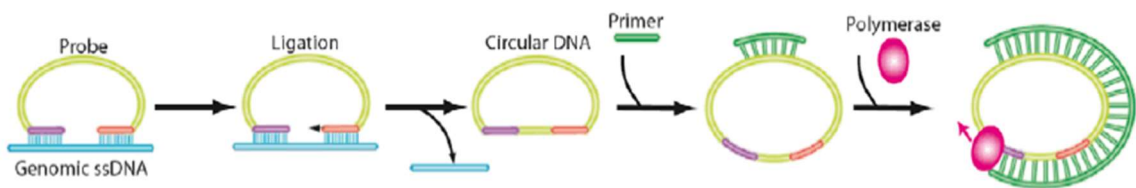
нуклеиновых кислот из последовательности-мишени. Процесс чрезвычайно быстрый и чувствительный, позволяющий обнаруживать небольшие количества ДНК-мишени в пределах минут. NEAR обычно используется для выявления патогенов в клинических образцах, а также в исследованиях биобезопасности<sup>7</sup>.

– ***transcription-mediated amplification (TMA)***<sup>8</sup>

Используется, в основном, для РНК-мишеней, но возможно применение и для ДНК. С помощью обратной транскриптазы синтезируется матричная двуцепочечная ДНК, с которой транскрибируется целевой продукт. РНК-полимераза распознает специфический регион, обычно используется T7 фрагмент и T7-ДНК-зависимая-РНК-полимераза.

– ***rolling-circle amplification (RCA)***<sup>9</sup>

Для кольцевых молекул (ДНК и РНК) или для порезанных на фрагменты и сшитых в кольца фрагментов геномной ДНК. Полимеразы (обычно Phi29, Bst, или Vent) синтезируют одноцепочечные кольцевые молекулы, которые потом легко детектировать. Используют для очень малого входного количества мишени. Схема технологии представлена на рисунке.



**Рисунок.** Схема технологии RCA

– ***Recombinase Polymerase Amplification (RPA)***

Технология RPA представляет собой изотермическую альтернативу ПЦР. Добавляя фермент обратной транскриптазы к реакции RPA, он может обнаруживать РНК, а также ДНК, без необходимости проведения отдельной стадии обратной транскрипции. Оптимальный диапазон температур: 37-42°C (также реакция медленно протекает при комнатной температуре). Технология RPA разработана TwistDx Ltd. (ранее известная, как ASM Scientific Ltd) (Кембридж, Великобритания)<sup>10</sup>. Схема технологии представлена на рисунке. Преимущества технологии RPA приведены в таблице (по данным производителя).

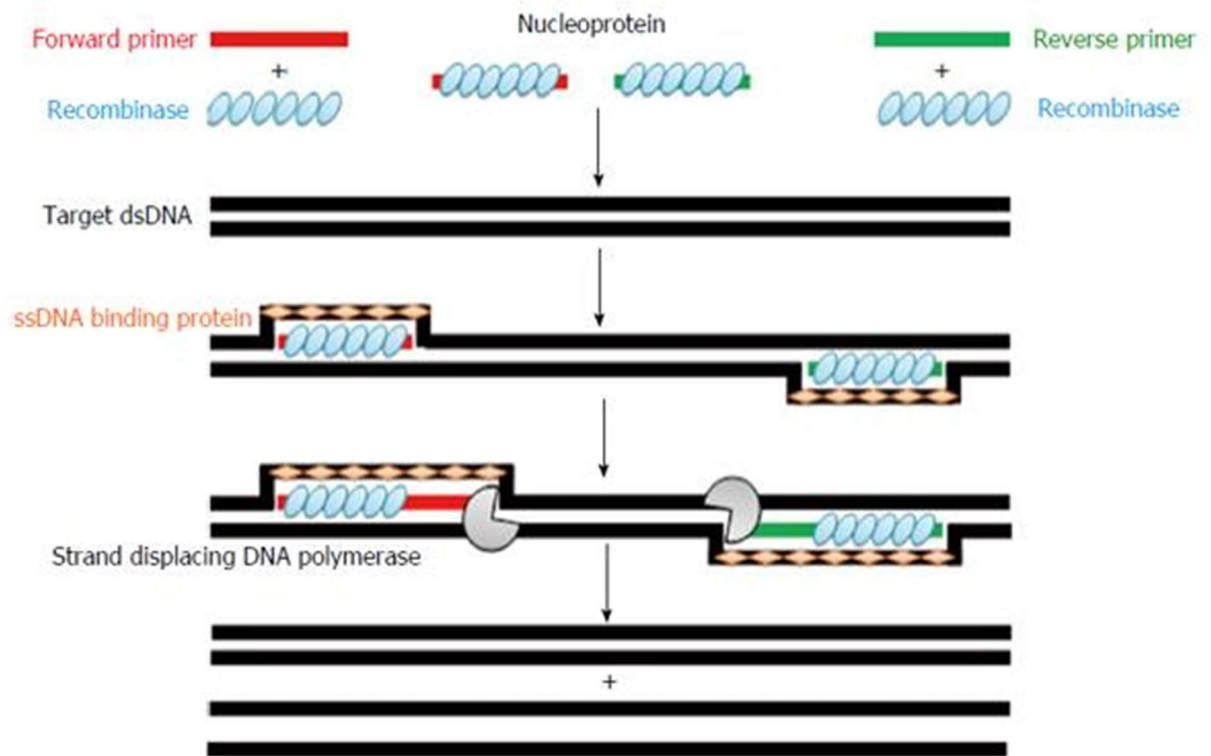
<sup>7</sup> <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification>

<sup>8</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=qQQtq1LaGL8>

<sup>9</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=ZDqsojQ8A5k>

<sup>10</sup> <https://www.twistdx.co.uk/en/rpa>





**Рисунок.** Схема технологии RPA

**Таблица.** Сравнительные характеристики RPA, LAMP и классической ПЦР по данным производителя

Техника	Схема (температура) инкубации	Время реакции (мин)	Применение, способ детекции	Возможность мультиплексирования
RPA	20-45	<10	Флуоресценция в реальном времени, латеральный поток, гель, NGS, SNP, dRPA, микрочипы, nesting, echem, в твёрдой фазе, мутность, микрофлюидика, невооружённым глазом	Да, включая несбалансированные по концентрации мишени
Классическая ПЦР	Цикл	20-180	Флуоресценция в реальном времени, латеральный поток, гель, NGS, SNP, dRPA, микрочипы, nesting, echem, в твёрдой фазе, мутность, микрофлюидика, невооружённым глазом	Да
LAMP	60-65	< 60	Флуоресценция в реальном времени, латеральный поток, гель, мутность, микрофлюидика, невооружённым глазом	Сложно (необходимо минимум 4 праймера на 1 мишень)



**Таблица. Патенты, описывающие технологию RPA**

Название патента\ авторы	Номер	Приоритет	Владелец
Recombinase polymerase amplification\Niall A. Armes, Derek L. Stemple	US7270981B2	21 февраля 2002	Alere San Diego Inc\ASM Scientific Inc
Methods for multiplexing recombinase polymerase amplification\ Olaf Piepenburg Colin H. Williams Niall A. Armes	US8062850B2	25 июль 2005	Alere San Diego Inc
Recombinase polymerase amplification reagents and kits\ Olaf Piepenburg, Niall A. Armes	US20120129173A1	05 июня 2009	Alere San Diego Inc

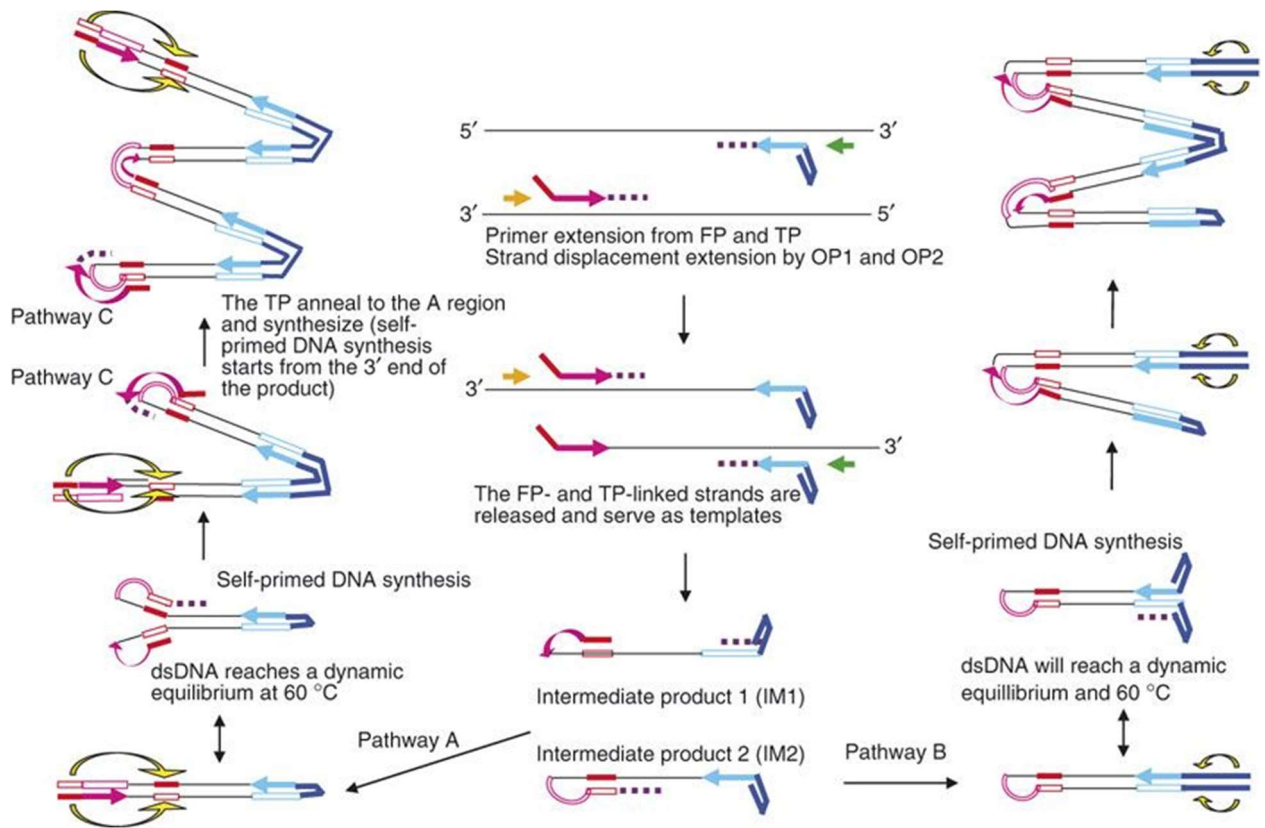
– ***Smart amplification process version 2 (SMAP2)***

Система быстрого обнаружения однонуклеотидного полиморфизма.

Процесс требует пять праймеров (TP, FP, boost primer (BP), внешние праймеры OP1 и OP2, смотрите рисунок). В начале процесса генерируются два промежуточных продукта: IM1 и IM2, далее из них синтезируются молекулы со шпильками (пути А или В), димерные ампликоны (self-priming – праймеры для ПЦР присутствуют в структуре шпильки) и более крупные продукты. При реализации пути С свободный TP-праймер отжигается на ампликон во внутреннем комплементарном сайте, синтезируется ДНК-цепь с замещением нити. Амплификация продолжается до тех пор, пока компоненты реакции не будут исчерпаны. Типичные выходы SMAP 2 превышают показатели ПЦР в 100 раз, длительность процесса – порядка 30 минут. В реакции используется полимеразы из *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Aac pol)<sup>11</sup>.

Разработано программное обеспечение, предназначенное для дизайна праймеров для SMAP 2. Благодаря этим новым инструментам технология высокоточной и быстрой ДНК-амплификации становится доступной для содействия фармакогенетическим исследованиям и применениям молекулярной диагностики.

<sup>11</sup> <https://www.nature.com/articles/nmeth1007>

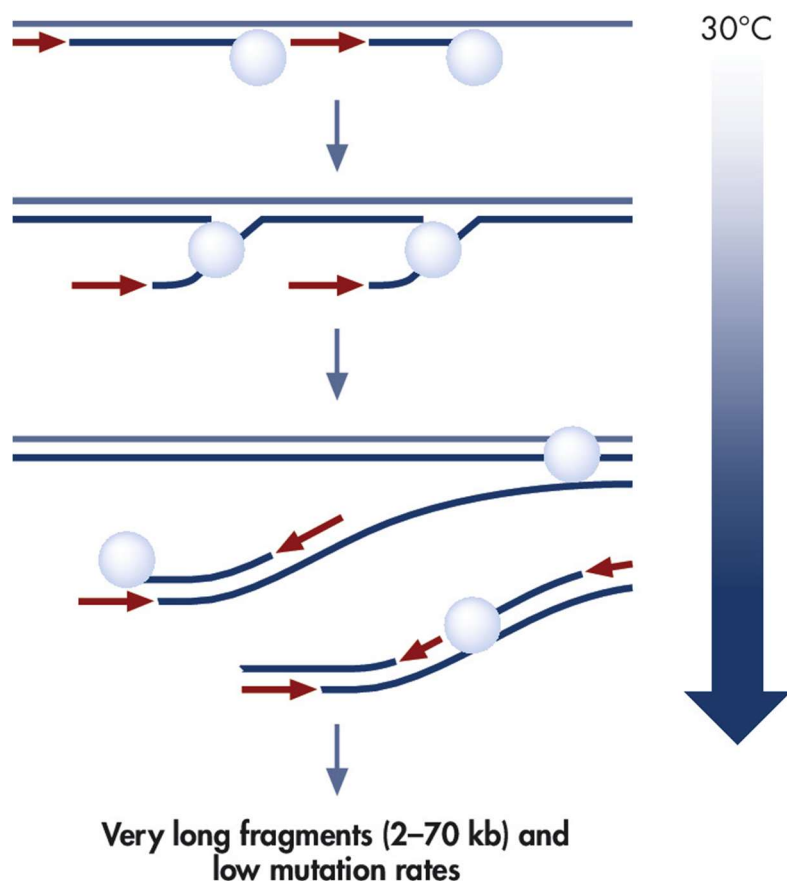


**Рисунок.** Принцип Smart amplification process version 2 (SMAP2).

– **Multiple Displacement Amplification (MDA)**

Метод основан на «репликации при смещении» последовательностей нуклеиновой кислоты. Каждая смещенная цепочка служит матрицей для амплификации. В технологии используются: неспецифические гексамерные праймеры, ДНК-полимераза  $\phi 29$  (из фага *Bacillus subtilis*) – отличается высокой точностью репликации (в 1000 раз выше по сравнению с ДНК-полимеразой Taq), способностью генерировать длинные фрагменты (до 100 кб без смещения последовательности), обладает 3'→5' простой экзонуклеазной активностью (коррекционная активность).  $\phi 29$  при способна проходить вторичные структуры, такие как шпильки, тем самым предотвращая возникновение дефектов амплификации. Схема технологии представлена на рисунке.

Использовано в технологии REPLI-g (QIAGEN, Германия). Типичные выходы ДНК достигают 40 мкг, независимо от исходного количества матрицы.



**Рисунок.** Схема технологии MDA. Праймеры (стрелки) отжигаются на матрице, полимеразы φ29 перемещаются вдоль цепи ДНК-матрицы, вытесняя комплементарную цепь, которая сама становится матрицей для репликации. В отличие от классической ПЦР, MDA не требует термоциклирования. В результате получаются очень длинные фрагменты с низким количеством ошибок<sup>12</sup>.

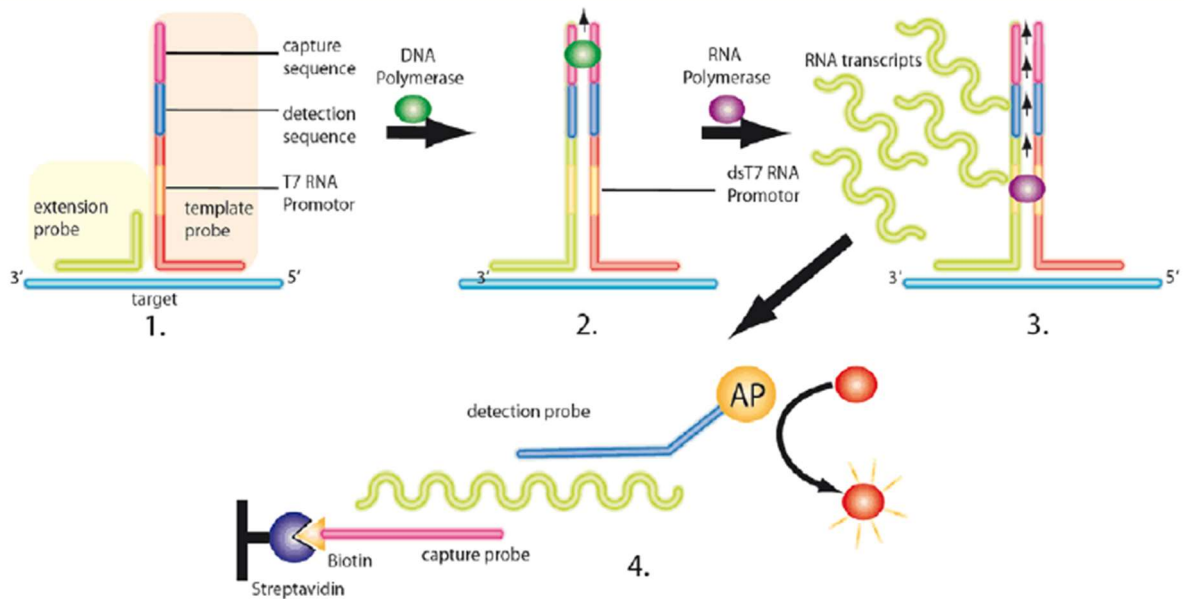
**Таблица.** Патенты, описывающие технологию MDA

Название патента \ авторы	Номер	Приоритет	Владелец
Multiple displacement amplification \ Frank B. Dean, Roger S. Lasken, Linhua Fang, A. Fawad Faruqi, Osama A. Alsmadi, Mark D. Driscoll, Seiyu Hosono	US6977148B2	15 октября 2001	Qiagen GmbH
Multiple displacement amplification \ Mark W. Eshoo, John Picuri, Curtis Phillipson	US20110118151A1	15 октября 2009	Ibis Biosciences Inc

<sup>12</sup> <https://www.qiagen.com/fr/resources/technologies/wga/replig-principal-procedure/>

– *Signal-mediated amplification of RNA technology (SMART)*<sup>13</sup>

Схема реакций SMART представлена на рисунке. Используются два олигонуклеотидных зонда. На первом этапе зонды гибридизуются друг с другом и ДНК-мишеню с образованием комплексного соединения, ДНК-полимераза удлиняет более короткий зонд. Полученная цепь включает в себя последовательность промотора T7 РНК-полимеразы – матрица для транскрипции с промоторной последовательностью, позволяющая продуцировать РНК с помощью РНК-полимеразы T7. На третьем этапе T7 РНК-полимераза продуцирует РНК. Возможны различные способы детекции результатов.



**Рисунок.** Технология SMART.

**Таблица.** Патенты, описывающие технологию SMART

Название патента\ авторы	Номер	Приоритет	Владелец
Nucleic acids extension assay\ Donald Leonard, Nicholas Cardy, Sabine Yolande, Joseph Delnatte	WO1993006240A1	13 сентября 1991	Cytocell Limited

– *Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA)*<sup>14</sup>

Последовательная независимая амплификация с одним праймером (SISPA) представляет собою иницированную праймером и модифицирующую исходную последовательность технику, обеспечивающую достижение неселективной логарифмической амплификации гетерогенной популяции ДНК. Метод контрастирует с

<sup>13</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11926174>

<sup>14</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1664049>

полимеразной цепной реакцией (ПЦР), который предполагает амплификацию уникальных или гомологичных последовательностей. SISPA требует направленного лигирования асимметричного линкера / праймера на целевую популяцию молекул ДНК с тупыми концами. Общая концевая последовательность позволяет использовать одну нить двуцепочечного линкера / праймера в повторных циклах отжига, пролонгации и денатурации в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы Taq. Линкер / праймеры содержат сайты рестрикционной эндонуклеазы и обеспечивают молекулярное клонирование всего 1 пкг исходного материала. SISPA особенно полезен, когда последовательность-мишень неизвестна и присутствует в ограниченных количествах, что затрудняет ее восстановление стандартными процедурами клонирования. Схема технологии представлена на рисунке.

**Таблица.** Патенты, описывающие технологию SISPA

Название патента\ авторы	Номер	Приоритет	Владелец
Non-specific dna amplification\ Michael Lovett, Gregory R. Reyes, Sherman M. Weissman, Linda M. Jorgenson	WO1991005861A1	16 октября 1989	Genelabs Incorporated

– ***Cross Priming Amplification (CPA)***<sup>15</sup>

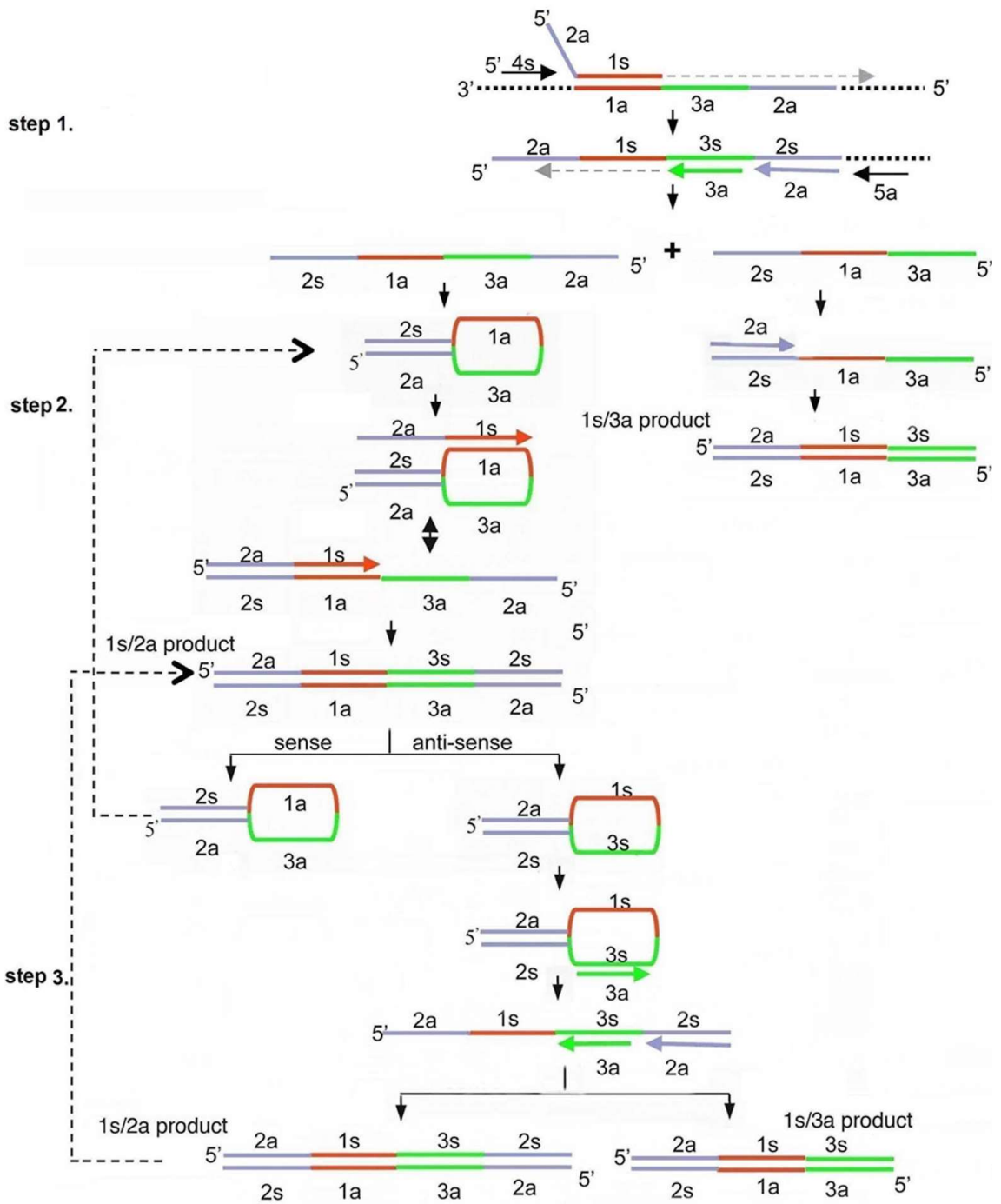
CPA представляет собой класс реакций изотермической амплификации, которые проводят с замещением цепи ДНК-полимеразой, не требующих начальной стадии денатурации или добавления никазы. Реакция проходит при 63°C. ДНК-мишень экспоненциально умножается в процессе реакции, для начала которой достаточно внести ДНК всего лишь четырёх бактериальных клеток<sup>16</sup>. Схема технологии представлена на рисунке.

<sup>15</sup> <https://www.nature.com/articles/srep00246>

<sup>16</sup> [https://www.researchgate.net/publication/221852535\\_Cross\\_Priming\\_Amplification\\_Mechanism\\_and\\_Optimizati\\_on\\_for\\_Isothermal\\_DNA\\_Amplification](https://www.researchgate.net/publication/221852535_Cross_Priming_Amplification_Mechanism_and_Optimizati_on_for_Isothermal_DNA_Amplification)

a.

Single crossing amplification



b.

TB IS6110 target sequence  
 GCCATCGTGGAAAGCGACCCGCCAGCCAGGATCCTGCGACGTAGGCGCTCGGTGACAA  
 AGGCCACGTAGGGCAACCCTGCCAGGTCGACACATAGGTGAGGTCTGCTAACCACA  
 GCCGGTTAGGTGCTGGTGGTCCGAAGCGCGCTGGACGAGATCGGGCGGACGGGCTGT

Xba I

1s. 5-TAGCAGACCTCACCTATGTGTCTTCTAGATCGGTGACAAAGGCCACGT  
 2a. 5-TAGCAGACCTCACCTATGTGTC  
 3a. 5-CTGGGCAGGGTTCGCCT  
 4s. 5-GCCATCGTGGAAAGCGA  
 5a. 5-ACAGCCGTCCCGCCGAT

Рисунок. Технология СРА.

**Таблица. Патенты, описывающие технологию CPA**

Название патента\ авторы	Номер	Приоритет	Владелец
Cross priming amplification of target nucleic acids\ Qimin You	WO2010080691A1	06 января 2009	Qimin You

– *Single Primer Enrichment Technology (SPET)*<sup>17</sup>

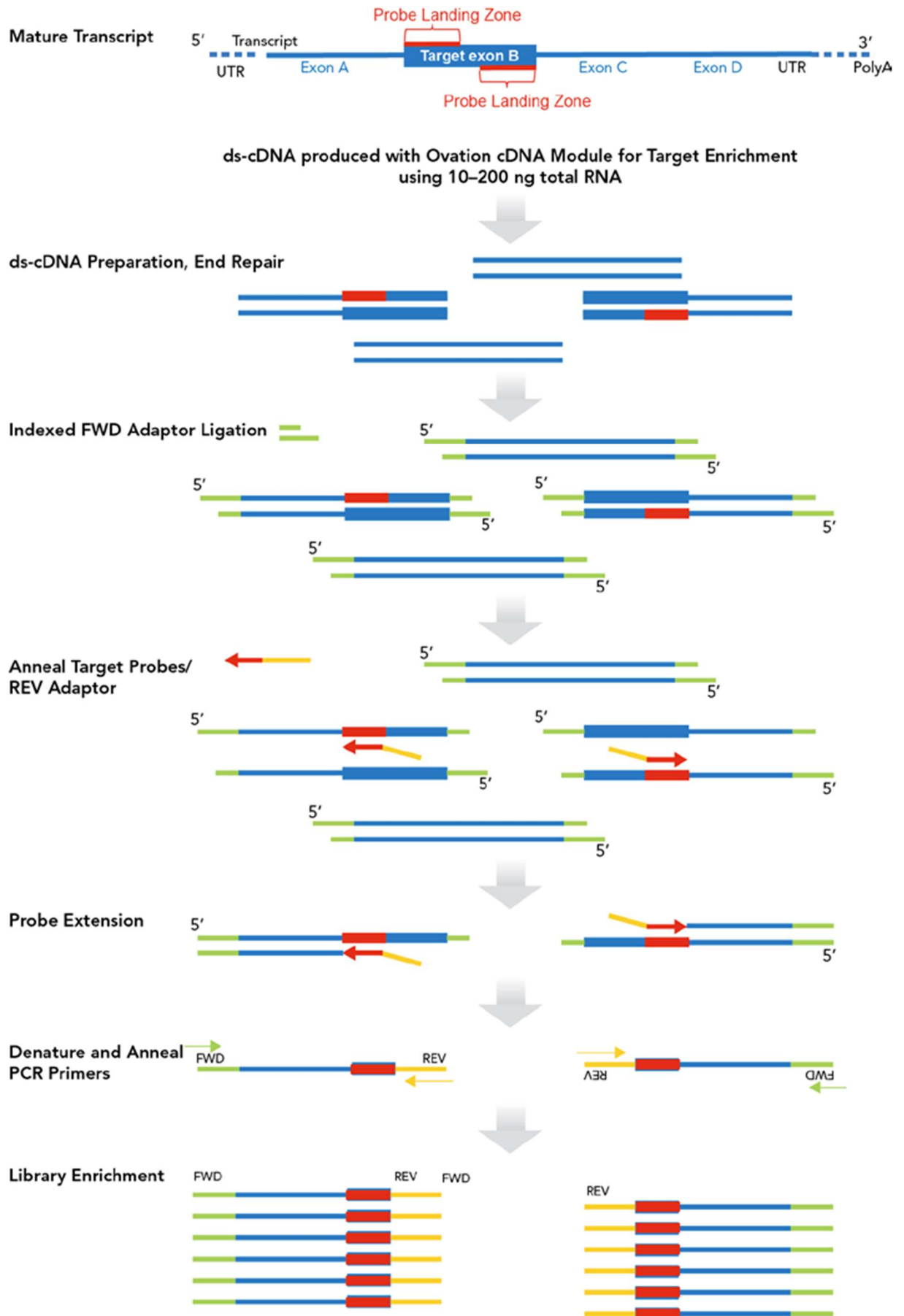
Схема технологии представлена на рисунке.

**Таблица. Патенты, описывающие технологию SPET**

Название патента\ авторы	Номер	Приоритет	Владелец
Compositions and methods for targeted nucleic acid sequence enrichment and high efficiency library regeneration	US9650628B2	25 января 2013	Nugen Technologies Inc.

<sup>17</sup> [https://www.nugen.com/sites/default/files/Poster-VIB-Leuven-2015-Fusion-Genes\\_0.pdf](https://www.nugen.com/sites/default/files/Poster-VIB-Leuven-2015-Fusion-Genes_0.pdf)





**Рисунок. Технология SPET.**

– Сравнение технологий изотермической амплификации

Isothermal systems	PCR	NASBA	SDA	LAMP	RCA	SMART	HDA	SPIA
Name of enzyme(s) used	Taq DNA polymerase	-RNase H, avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, T7 DNA-dependent RNA polymerase	<i>Escherichia coli</i> DNA polymerase 1, T7 RNA polymerase	Bst/Bsm DNA polymerase; Csa DNA polymerase; OmniAmp polymerase for both RNA/DNA	Bacteriophage Ø29 DNA polymerase	Bst DNA Polymerase, T7 RNA polymerase and DNA polymerase	DNA helicase, exonuclease -deficient DNA polymerases	DNA polymerase, RNaseH, reverse transcriptase
No. of enzyme(s)	1	2-3	2	1	1	2-3	2	2-3
Time	2-3 h	within 2 h	16-18 h	Within 1 h	Within 1 h	2-3 h	2 h	3-4 h
Temp (s) °C	95, 55-60, 72	41	37	60-66	37	41	37, 60-65	45, 50
Denaturing agents	Heat	RNaseH	Restriction enzymes, Bumper primers	Betaine	Phage Ø29 DNA polymerase	RNaseH	helicase	RNaseH
Tolerance to crude samples	-	-	-	+	-	-	+	-
Primer design	simple	simple	complex	complex	simple	complex	simple	simple
Detection methods used	AGE	Auto-fluorescence By a common microplate reader; Molecular beacon fluorescence; Real-time fluorescence; Molecular beacon fluorescent probe technology	visual detection by fluorescent and metal ion indicator dyes; LFD	Optical detection of turbidity; visual detection by fluorescent and metal ion indicator dyes; LFD	Electrophoretic analysis; Fluorescence image; flow cytometry; Visual fluorescence atomic force microscopy; Real-time fluorescence; Laser scanning and image analysis	Real-time fluorescence Gel electrophoresis; real-time fluorescence	Real-time fluorescence Naked eye by an enzymatic process employing the dye Tetramethylbenzidine (TMB) Visual detection Electrochemical analysis	Real-time fluorescence Gel electrophoresis; real-time fluorescence

PCR: Polymerase Chain Reaction; HAD: Helicase-Dependent Amplification; LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification; SDA: Strand Displacement Amplification; NASBA: Nucleic Acid Sequence Based Amplification; RCA: Rolling Circle Amplification; SMART: Signal-Mediated Amplification of RNA Technology; SPIA: Single Primer Isothermal Amplification; DNA: Deoxyribonucleic Acid; RNA: Ribonucleic Acid; Bst: *Bacillus stearothermophilus*; Taq: *Thermus Aquaticus*; AGE: Agarose Gel Electrophoresis

## 2. Описание продукции

Преимущества технологии – скорость получения результата (порядок до 30 мин от момента забора образца) – важный показатель при тестировании пациентов в клинике.

Для реализации технологии требуются оборудование, реагенты и расходные материалы. Технология может быть открытой (любые реагенты и расходные материалы для любого оборудования) или закрытой (картриджи, чипы). Открытые системы традиционно сложнее в использовании и часто предлагаются для научных исследований (возможна оптимизация условий). Закрытые системы (в различной степени) используются в диагностике, ветеринарии, криминалистике.

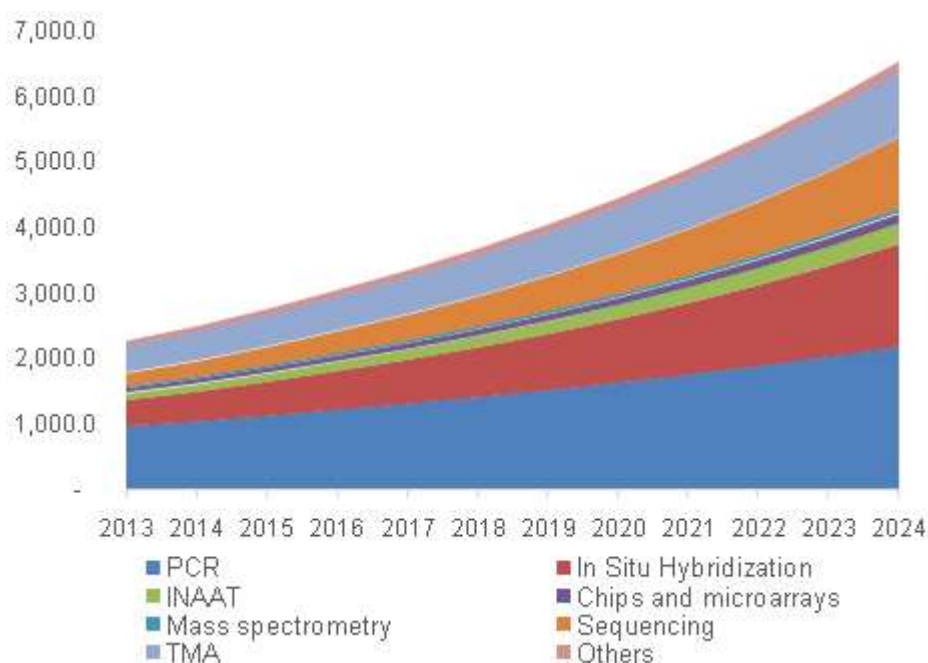
Как и случае с классической ПЦР, детекция результатов может осуществляться по конечной точке (флуоресценция, электрофорез, ТСХ) или в реальном времени.

В первом случае специальное оборудование требуется только на стадии детекции, для амплификации может использоваться обычный термостат. Во втором случае может использоваться стандартный амплификатор либо специальное оборудование.

### 3. Мировой рынок

Для поиска на английском языке – эквивалент «Isothermal Nucleic Acid Amplification Technology (INAAT) Market».

Рынок изотермической ПЦР – составная часть рынка молекулярной диагностики. На рисунке 1 представлен прогноз развития рынка молекулярной диагностики до 2024 года<sup>18</sup>. Авторы прогноза не видят тенденций к значительному пересмотру структуры рынка. По-прежнему, главенствующее положение занимает классическая ПЦР и in situ гибридизация, минимальный объём у изотермической амплификации (INAAT), микрочипов и масс-спектрометрии. Значительно вырастут секвенирование и Transcription mediated amplification (ТМА). Авторы исследования выделяют технологию ТМА в отдельный сегмент несмотря на то, что формально – это технология изотермической амплификации.



**Рисунок.** Развития рынка молекулярной диагностики до 2024 года

Объём мирового рынка иПЦР в 2016 году составил 1.6 млрд. долларов США<sup>19</sup> (в 2013 данный показатель составлял 841.17 млн. долларов США<sup>20</sup>). По мнению экспертов технология станет драйвером рынка диагностики. Согласно прогнозам к 2025 году объём

<sup>18</sup> <https://grandviewresearchinc.blogspot.com/2015/11/molecular-diagnostics-market-growth.html>

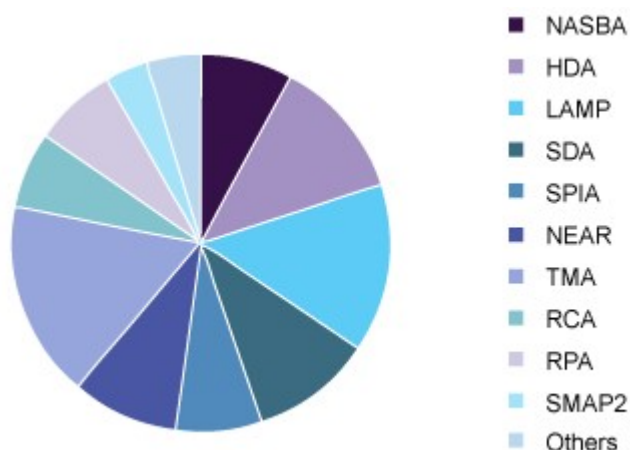
<sup>19</sup> Отчёт: «Isothermal Nucleic Acid Amplification Market: By Technology (Revenue, USD Million, 2014 - 2025)»

<sup>20</sup> <http://www.micromarketmonitor.com/market-report/isothermal-nucleic-acid-amplification-reports-8898707509.html>

рынка составит 4.3 млрд. долларов США, динамика роста – 11.8% в год<sup>21</sup> (по другим данным – 13.5%<sup>22</sup>).

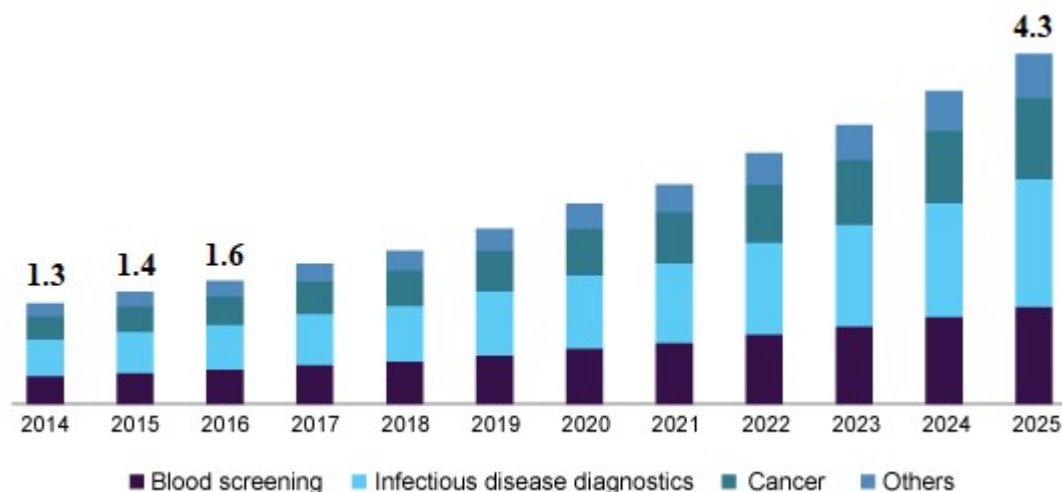
Доля на рынке основных модификаций метода изотермическом амплификации представлена на рисунке. Представленность технологий приблизительно одинакова, однако, технологии LAMP, TMA и HDA занимают более выраженную долю рынка.

Ожидается преимущественный рост сегментов HDA и NEAR, а также NASBA.



**Рисунок.** Представленность на рынке технологий изотермической амплификации. Данные за 2016 год<sup>23</sup>.

Использование технологии возможно в различных областях рынка. На рисунке представлена динамика роста рынка иПЦР в различных сегментах. Драйверами роста, считается, станут скрининг крови и диагностика инфекционных заболеваний.



**Рисунок.** Рынок иПЦР с указанием сегментов.

<sup>21</sup> <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-isothermal-nucleic-acid-amplification-technology-inaat-market>

<sup>22</sup> <https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/inaat-market.asp>

<sup>23</sup> Отчёт: «Isothermal Nucleic Acid Amplification Market: By Technology (Revenue, USD Million, 2014 - 2025)»

Основные ожидаемые точки роста:

- ВИЧ, гепатиты А/В;
- ИППП;
- заболевания с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией (вирус Зика, туберкулёз, грипп, другие заболевания).

В настоящий момент ИПЦР широко применяется в США для диагностики ВИЧ-СПИД, *H. influenzae*, *S. pneumonia* (инфекции респираторного тракта), *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* (урогенитальные инфекции) и туберкулёза.

### Основные игроки на рынке:

**1. Alere** (составная часть корпорации Abbott, специализируется на разработке и производстве РОС)

Abbott купила Alere (сделка 03.10.2017 г.) за 4.5 млрд. долларов США<sup>24</sup>. Финансовые показатели компании приведены в таблице.

**Таблица.** Выручка компании Abbott и её изменение в 2016-2017 гг. (доля составных частей группы диагностики рассчитана от суммы показателей группы)

Группа продукции	2017		2016		Изменение
	Выручка	Доля	Выручка	Доля	
Established Pharmaceuticals	4287	16%	3859	15%	11%
Nutritionals	6925	25%	6899	26%	0%
Diagnostics*	5616	21%	4813	18%	17%
-- Core Laboratories Diagnostics	4063	72%	3844	80%	6%
-- Molecular Diagnostics	463	8%	456	9%	2%
-- Point of Care	550	10%	513	11%	7%
-- Rapid Diagnostics (Alere)	540	10%	n/d	n/d	n/d
Cardiovascular and Neuromodulation	8911	33%	8911	34%	0%
Всего по сегментам	25739		24482		5%
Другие	1651	6%	1651	6%	0%
Всего	27390		26133		5%

Продажи всех категорий продукции в России составили 664 млн. долларов (2,4% от общего объёма продаж).

<sup>24</sup> <http://www.abbottinvestor.com/static-files/e83a9e54-b5ca-48c0-88c1-27c4713fabf4>

Группа продукции на основе технологии изотермической амплификации относится к компании Alere. Общие продажи продукции в 2017 году составили 540 млн. долларов США.

По технологии изотермической амплификации (без уточнения) работает прибор Alere™ i:



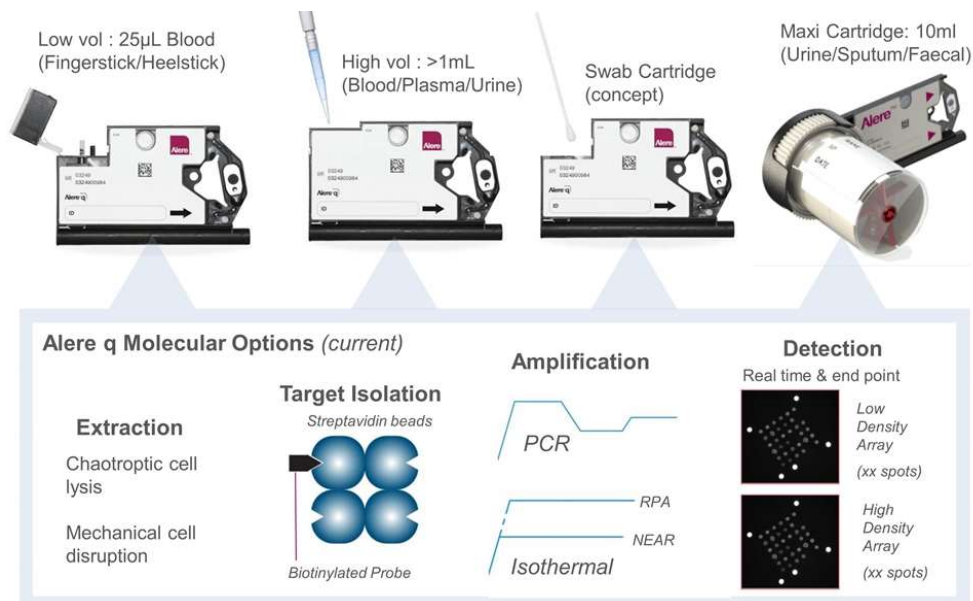
- клинические исследования: 2014 год,
- система закрытая (Alere™ i) – картридж,
- материал – мазок из полости рта (для вирусов гриппа), мазок из носа (свежий или в транспортной среде – для RSV), мазок из носоглотки (для Strep A)
- технология изотермической амплификации,
- качественный анализ, флуоресцентная детекция,
- время детекции: 8-20 минут,
- управление: сенсорный дисплей,
- доступны тесты: вирус гриппа A&B (одобрен FDA 06.2014, второе поколение 10.2017), Strep A (одобрен FDA 03.2015), RSV (одобрен FDA 10.2016)
- чувствительность: 92.5 – 95.9%;
- специфичность: 86.2 – 94.6%.

Аналогично по технологии изотермической амплификации (технология СМА: competitive reported monitored amplification<sup>25</sup>) работает прибор Alere™ q<sup>26</sup>, предназначенный для детекции РНК ВИЧ-1 групп М, N и О, а также ВИЧ-2. Прибор автономный, со встроенным принтером, память на 1000 тестов. Анализ протекает на чипе (на вход – 25 мкл капиллярной крови).

<sup>25</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963486/>

<sup>26</sup> <https://www.alere.com/en/home/product-details/alere-q-analyser.html>





Аналогично по технологии изотермической амплификации (без уточнения) работает прибор Alere Pima™ Analyser<sup>27</sup>, предназначенный для определения абсолютного количества CD4 лимфоцитов (T-helper клетки), время определения – 20 минут. Все процессы (около 25) интегрированы в картридж, протекают без участия оператора, контроль встроен в картридж.



<sup>27</sup> [https://www.alere.com/en/home/product-details/Alere\\_Pima\\_CD4\\_Cartridge.html](https://www.alere.com/en/home/product-details/Alere_Pima_CD4_Cartridge.html)



## 2. bioMerieux SA (публичная компания, основана 1963 году, Франция)

Компания разрабатывает и производит средства для *in vitro* диагностики.

Тест для анализа ВИЧ-1 по технологии NASBA выпущен компанией в 2002 году<sup>28</sup>.

Оборудование и реагенты для решений по технологии NASBA – линейка NUCLISENS® EASYQ – иПЦР в классическом формате (пробирки) (наборы для научных исследований, ВИЧ и ВПЧ).

На сайте компании появилась новость (14.12.2017 г.) о переводе Accelerated Analytical Labs (тестирование качества пищевых продуктов) с изотермической ПЦР на технологию Gene UP – классической ПЦР<sup>29</sup>, что косвенно может свидетельствовать о недостатках технологии иПЦР. Одновременно, в портфолио компании мало продуктов, работающих по иПЦР-технологии.

## 3. Eiken Chemical Co. Ltd. (публичная компания, основана в 1939 году, Япония)

В сентябре 2004 Eiken Chemical основала Eiken Shanghai Co., Ltd. в Китае, в апреле 2007 г. произошло слияние последней с Eiken Kizai Co., Ltd., основанной ранее. Основные продукты: фекальный иммунохимический тест для поиска скрытой крови (автоматы), микробиологии и серологии, а также быстрые тесты (norovirus в кале, *Legionella pneumophila* и *Streptococcus pneumoniae* в моче). По итогам 2017 года (01.04.2017 – 31.03.2018 гг.) продажи на местном рынке – 84.6% (рост 1.4%, выше прогнозов на 0.9%), других рынках – 15.4% (рост 32.3%, ниже прогнозов на 17.1%). Реагенты и оборудование для биохимических исследований – снижение на 0.6-0.7%.

Финансовые показатели компании приведены в таблице. Наблюдается стагнация/незначительный рост по основным продуктовым позициям.

**Таблица.** Финансовые показатели компании Eiken Chemical Co. Ltd. за 2016-2017 гг.

Наименование	2017		2016		Изменение
	Выручка	Доля	Выручка	Доля	
Fecal immunochemical test reagents (FIT)	81,43	26%	73,06	24%	10%
Immunological and serological reagents (excluding fecal immunochemical test reagents)	89,87	29%	88,71	30%	1%

<sup>28</sup> Multicenter Performance Evaluation of NucliSens EasyQ HIV-1. M. Segondy, B. Montes, V. Soriano, H. Cuypers, V. Ferre, M. Koppelman, C. De Mendosa, T. Oosterlaken and P. van de Wiel Data presented at the ECCMID Conference, April 24-27, 2002, Milan (Italy).

<sup>29</sup> <http://www.biomerieux-industry.com/accelerated-analytical-labs-selected-gene>

Urina lysis test strips	26,04	8%	21,94	7%	16%
Microbiological test reagents	45,68	15%	45,39	15%	1%
Biochemical test reagents	5,45	2%	5,48	2%	0%
Equipment/Culture medium related to food and environmental	19,56	6%	19,70	7%	-1%
Related molecular genetics (LAMP), (including its devices)	10,68	3%	11,71	4%	-10%
Medical Devices (excluding molecular genetics related devices)	34,90	11%	32,22	11%	8%
Total sales, млн. долларов США	313,61	100%	298,20	100%	5%

Оборудование и реагенты для молекулярной диагностики представлены технологией LAMP. Patents WO 00/28082, WO 01/34790, WO 01/77317 – метод LAMP (метод разработан в 1998 году). Продажи в 2017 году составили 3.4% всех продаж компании (1192 млн. йен – 10.683 млн. долларов США; снизились по сравнению в 2016 годом на 8.7%).

- Оборудование: Realtime Turbidimeter LA-500 CE-марка (управляющий блок со встроенным принтером, нагревательные модули с флуоресцентными детекторами (2 независимых блока по 8 пробирок), максимум – 6 модулей, детектор – LED 650 нм, USB-порт), общее время анализа – до 2 часов, реакция – в пробирках на 200 мкл – стрипы.



- Реагенты для LAMP-амплификации линейки Loopamp для анализа пищевых продуктов (Salmonella, Verotoxin-producing Escherichia coli, Verotoxin, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Campylobacter) и объектов из окружающей среды (Legionella, Cryptosporidium, Giardia). Хранение при -20C<sup>30</sup>.

<sup>30</sup> <http://loopamp.eiken.co.jp/e/index.html>

- Комплексное решение для первичной диагностики туберкулёза TB-LAMP: продаётся Human (Германия)<sup>31</sup>, включает экстракцию из мокроты, амплификацию LAMP, визуальную детекцию (оборудование LF-160 SE-марка или HumaLoop T + шейкер NuMax ITA), анализ вне лаборатории, общее время – 1-2 часа (производительность – до 70 образцов в день), реагенты лиофилизированы – транспортировка и хранение от 1 до 30С, работа при температуре окружающей среды – до 40С, чувствительность – 80-100%, специфичность >95%. Тест рекомендован ВОЗ в качестве средства ранней диагностики туберкулёза в 2016 году<sup>32</sup>, включён в список Global Drug Facility<sup>33</sup>.
- Комплексное решение для диагностики малярии Malaria-LAMP<sup>34</sup>: продаётся Human (Германия)<sup>35</sup>, включает экстракцию из крови, амплификацию LAMP, визуальную детекцию (оборудование LF-160 SE-марка или HumaLoop T + шейкер NuMax ITA), анализ вне лаборатории, общее время – 1-2 часа (производительность – до 70 образцов в день), реагенты лиофилизированы – транспортировка и хранение от 1 до 30С, работа при температуре окружающей среды – до 40С, чувствительность – 96-100%, специфичность >97%.

Компания публичная.

#### – **Hologic, Inc. (Gen-Probe)**

Продукция, работающая по технологии TMA:

- The Panther system – робот, предназначенный для автоматизации наборов реагентов линейки Aptima для качественного и количественного определения: CT/NG, Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, HIV-1, Neisseria gonorrhoeae, HCV, Trichomonas vaginalis, HBV, HPV, HSV 1 & 2, HPV 16 18/45, Zika Virus; в разработке – Bacterial Vaginosis и Candida vaginitis;
- Время анализа 8 часов для 320 образцов;
- 

#### – **Lucigen (1998 г., Висконсин, США).**

Компания производит реагенты и расходные материалы для исследований в области биомедицины (ферменты, наборы для исследования экспрессии белков, клонирования, создания компетентных клеток, секвенирования и молекулярной диагностики).

---

<sup>31</sup> [https://www.human.de/fileadmin/content/flyer/en/981014\\_TB-LAMP\\_EN.pdf](https://www.human.de/fileadmin/content/flyer/en/981014_TB-LAMP_EN.pdf)

<sup>32</sup> [http://www.who.int/tb/features\\_archive/TB\\_LAMP/en/](http://www.who.int/tb/features_archive/TB_LAMP/en/)

<sup>33</sup> <https://berkeleycenter.georgetown.edu/programs/global-drug-facility>

<sup>34</sup> <https://www.human.de/fileadmin/content/flyer/en/981014.pdf>

<sup>35</sup> [https://www.human.de/fileadmin/content/flyer/en/981014\\_TB-LAMP\\_EN.pdf](https://www.human.de/fileadmin/content/flyer/en/981014_TB-LAMP_EN.pdf)

Линейки продукции LavaLAMP™, OmniAmp® and Bst Polymerase, Exonuclease минус продаются Lucigen по лицензии Eiken Chemical Co. Ltd. только для научных исследований. Продукты на могут быть использованы для диагностики без дополнительного лицензирования Eiken. US Patent 8093030 для LavaLAMP и OmniAmp принадлежит Lucigen Corp.

Дистрибьютор в России – Альбиоген.

- **QIAGEN** (основана в 1982 году, операционная деятельность – с 1986 года, Германия)

Производит решения для молекулярной диагностики. Выручка на данном рынке в 2017 году составила 1.42 млрд. долларов США (88% - расходные материалы, 12% - оборудование), из них 48% - рынок, собственно, диагностики, 52% - LifeSciences (сегменты научных, фармацевтических и прикладных исследований). Рост на развивающихся рынках (включая Россию) – 16% (общий рост – 6%).

В январе 2017 года QIAGEN поглотила OmicSoft Corporation (ведущий поставщик решений для управления omics-данными, г. Кэри, Северная Калифорния, США). В 2016 году QIAGEN купила 100% акций Exiqon A/S (публичная датская компания – лидер в области решений для анализа РНК по технологии Locked Nucleic Acid (LNA)) за 100.682 млн. долларов США, плюс расходы на поглощение – 6.3 млн. долларов США. В 2015 году QIAGEN поглотила MO BIO Laboratories (частная компания – специализация в области пробоподготовки в области метагеномики и микробиомики). Стоимость сделки – 66.9 млн. долларов США.

Некоторые финансовые показатели компании представлены в таблицах<sup>36</sup>. В целом финансовые показатели растут (4-6% в год). Выручка по регионам неизменна в 2015-2017 гг. (>40% - США, >30% - Европа и Африка, >20% - Азия). В QIAGEN сильно развит маркетинг и финансовая часть бизнеса (затраты в 2.5 раза превышают R&D). Расширение портфолио, в основном, достигается за счёт поглощений.

Рост в 2017 (14%) наблюдается в прикладных исследованиях (Applied Testing), которые представлены, в основном, решениями для криминалистических лабораторий. Также рост в сегменте научных исследований (Academia) – активный вывод на рынок и продажи решений для NGS (в первую очередь реагентов).

**Таблица. Продажи компании QIAGEN в 2015-2017 гг. в долларах США**

Доллары США	2017	2016	2015
Net Sales	1417536	1337991	1280986

<sup>36</sup> Финансовые отчёты компании за 2015-2017 гг.

-- Consumables and related revenues	1242715	1166130	1114580
-- Instrumentation	174821	171860	166406
Cost of sales	494975	493338	454328
<b>Gross profit</b>	<b>922561</b>	<b>844653</b>	<b>826658</b>
<b>Operating expenses:</b>			
-- Research and development	154084	149841	146830
-- Sales and marketing	375562	376321	359598
-- General and administrative, restructuring, integration and other	200098	180573	102066
-- Acquisition-related intangible amortization	39398	39091	38666
<b>Total operating expenses</b>	<b>769142</b>	<b>745826</b>	<b>647160</b>
<b>Income from operations</b>	<b>153419</b>	<b>98827</b>	<b>179498</b>

**Таблица.** Продажи компании QIAGEN по регионам в 2015-2017 гг. в долларах США

Region Sales	2017			2016			2015	
	Выручка	Доля	Рост	Выручка	Доля	Рост	Выручка	Доля
United States	579906	41%	4%	555676	42%	6%	525532	41%
Other Americas	73478	5%	2%	71797	5%	-10%	79578	6%
Europe, Middle East and Africa	462980	33%	8%	428055	32%	4%	409955	32%
Asia Pacific and Rest of World	301172	21%	7%	282463	21%	6%	265921	21%
<b>Net Sales</b>	<b>1417536</b>		<b>6%</b>	<b>1337991</b>		<b>4%</b>	<b>1280986</b>	

**Таблица.** Продажи компании QIAGEN по сегментам рынка в 2015-2017 гг. в долларах США

Market Sales	2017			2016		
	Выручка	Доля	Рост	Выручка	Доля	Рост
Molecular Diagnostics	683000	48%	3%	663000	50%	4%

Applied Testing	137000	10%	14%	120000	9%	5%
Pharma	275000	19%	5%	262000	20%	5%
Academia	323000	23%	10%	293000	22%	4%

Рост сегмента диагностики стабилен (5%). Данный сегмент представлен классическими решениями для молекулярной диагностики (оборудование и расходные материалы для ПЦР в реальном времени). Новинки – оборудование и реагенты для NGS-диагностики в онкологии (2015-2016 гг.)

Сегмент изотермических реакций в явном виде в рост не заложен.

Оборудование для проведения изотермической амплификации ESEQuant TS2 (аналог Solana Quidel) совместно со SpeedXtract Nucleic Acid Kit позиционируется, как средства для R&D. Готовых решений для диагностики на базе данного оборудования у компании нет.

Система REPLI-g на основе технологии MDA также предназначена для неспецифического увеличения исходного количества ДНК при проведении научных исследований (любых исследований, где необходимо достаточное количество образца). Работает на основе полимеразы Phi29.

#### Таблица. Патенты

Номер	Приоритет	Публикация	Название
US7074600B2	2001-10-15	2006-07-11	Amplification of denatured and stabilized nucleic acids
US7955795B2*	2003-06-06	2011-06-07	Method of whole genome amplification with reduced artifact production
US9487823B2	2002-12-20	2016-11-08	Nucleic acid amplification
US9683255B2	2005-09-09	2017-06-20	Method for activating a nucleic acid for a polymerase reaction
CA2510587A1	2002-12-20	2004-07-15	Nucleic acid amplification
US6977148B2 *	2001-10-15	2005-12-20	Multiple displacement amplification
US7297485B2 *	2001-10-15	2007-11-20	Method for nucleic acid amplification that results in low amplification bias
US7553619B2 *	2002-02-08	2009-06-30	Detection method using dissociated rolling circle amplification

US8043834B2	2003-03-31	2011-10-25	Universal reagents for rolling circle amplification and methods of use
US8309303B2	2005-04-01	2012-11-13	Reverse transcription and amplification of RNA with simultaneous degradation of DNA
DE102006020885A1	2006-05-05	2007-11-08	Einführung von Sequenzelementen in Nukleinsäuren
EP2420579A1	2010-08-17	2012-02-22	Helicase dependent isothermal amplification using nicking enzymes
US9074248B1	2012-12-18	2015-07-07	Primers for helicase dependent amplification and their methods of use

В России – представительство.

**Quidel Corporation** (1984 г. – первая продукция на рынке, Калифорния, США, Nasdaq: QDEL)<sup>37</sup>.

Производитель в области диагностики и здравоохранения.

Основные направления деятельности компании: (1) lateral flow, where we are market leaders in infectious disease and reproductive health; (2) direct fluorescent antibodies (DFA), with expertise in infectious disease and virology; (3) micro-titer production, with a focus on bone and complement pathway markets; (4) fluorescent immunoassay products (Sofia); and (5) molecular diagnostic products including the world’s first FDA-cleared handheld molecular device, AmpliVue. Additional molecular and Sofia tests are currently in development or in clinical trials as part of a robust product pipeline.

Сегмент изотермических реакций в явном виде заложен в рост показателей.

Продукция для молекулярной диагностики включает линейки продукции: ApliVue (HAD-технология), Solana (HAD, оборудование и расходные материалы), Savanna (HDA) и Lyra (классическая ПЦР). Выручка компании в 2017 году в данном сегменте составила 13636 млн. долларов США (общая выручка за 2017 год – 277743 млн. долларов США), рост по сравнению с 2016 годом составил 43% в год.

Дистрибьютор в России – нет.

Решения с использованием технологии изотермической амплификации (вариант HDA):

<sup>37</sup> <https://www.quidel.com/>





- Оборудование: Solana (анализ в пробирках, лизис отдельно, нужен термошейкер/термостат, одновременно – 12 образцов, автономный – батарея/ принтер, связь с ЛИС, USB, 4 кг, 24x24x15 см),
- Совместимые с Solana наборы реагентов для *in vitro* диагностики (качественный анализ, результат от 30 до 50 минут, хранение при +2...+8С до 2 лет):
  - Solana Bordetella Complete Assay – *Bordetella pertussis* и *Bordetella parapertussis* в мазках из носоглотки,
  - Solana C. difficile Assay – *Clostridium difficile* Toxin A ген (*tcdA*) в образцах фекалий,
  - Solana GAS Assay – группа А β-гемолитический *Streptococcus (Streptococcus pyogenes)* в мазках из носоглотки,
  - Solana GBS Assay – Группа В *Streptococcus* из вагинальных/ ректальных мазков, требуется инкубация в течение 18-24 часов на LIM или Carrot средах,
  - Solana HSV 1+2/VZV Assay – дифференциальная диагностика вирусов Herpes HSV-1, HSV-2, и Varicella-zoster virus (VZV) в мазках слизи или с кожных покровов,
  - Solana Influenza A+B Assay – для дифференциальной диагностики вирусов А и В в мазках из носоглотки;
  - Solana Respiratory Viral Panel – Solana Influenza A+B и Solana RSV + hMPV,
  - Solana RSV + hMPV Assay – дифференциальная диагностика Respiratory Syncytial Virus (RSV) и Human Metapneumovirus (hMPV) в мазках из носоглотки,
  - Solana Strep Complete Assay – Группа А β-гемолитический *Streptococcus (Streptococcus pyogenes)*, и пирогенный Группа C/G (*Streptococcus dysgalactiae*) в мазках из носоглотки,
  - Solana Trichomonas Assay – для диагностики трихомонады в урогенитальных мазках или моче.

- Линейка продукции AmpliVue (качественное определение)



На основе технологии HDA (амплификация в пробирке в обычном термостате, детекция – в специальной cassette: латексные бусы, покрытые стрептавидином на подложке в cassette взаимодействуют с биотином, разделение – ТСХ, детекция – зонды с красителями FITC, DNP, DIG), время детекции – 60-80 минут, хранение при +2...+8С до 2 лет:

- AmpliVue Bordetella Assay
- AmpliVue C. difficile Assay
- AmpliVue GBS Assay
- AmpliVue HSV 1+2

**New England Biolabs** (частная непубличная компания, основана в 1974 году, США)

Компания разрабатывает и производит реагенты и ферменты для геномных исследований. В сегменте изотермической ПЦР продукция компании охватывает следующие технологии: LAMP, SDA, HDA, NEAR.

**Nugen** (частная непубличная компания, основана в 2000 году, Калифорния, США)

Инвестиции в компанию: 31 млн. долларов США.

Компания разрабатывает инновационные продукты для NGS для работы с широким спектром образцов, включая РНК, ДНК, ткани, образцы FFPE, единичные клетки, образцы жидкой биопсии. Наборы (*Single primer isothermal amplification (SPIA)*) на основе технологии изотермической амплификации предназначены для получения кДНК в стехиометрических количествах к исходному количеству РНК в образце. Применение: RNA-seq, qPCR, экспрессия генов, microarray, WTA, анализ образцов FFPE, LCM, клеточных линий, тканей. Технология реализована в наборах:

- Ovation RNA-Seq System V2 (подготовка библиотек RNA-Seq за 7 часов; используется для детекции редких транскриптов, вирусов и неизвестных патогенов; работа с РНК из тканей LCM, мокроты, клеток, жидкой биопсии,

прокариот, вирусов и других типов образцов; возможность автоматизации на Agilent Bravo, Beckman Biomek FXP, Perkin Elmer Sciclone, Hamilton Star/Starlet)

- Ovation RNA-Seq FFPE System (для работы с фрагментированной и химически изменённой РНК – типичные FFPE-образцы; подготовка к RNA-seq на NGS-платформах; время пробоподготовки – не более 6 часов)
- Trio RNA-Seq.

### **Ustar Biotechnologies** (2005 год, Гуанджоу, Китай)

Компания – местная, только собирается выходить на мировой рынок, ищет дистрибьюторов.

Продукты – наборы реагентов для диагностики на основе изотермической ПЦР (NEMA и CPA – патенты). Хранение и транспортировка: -20С. Детекция – ТСХ в специальной одноразовой ячейке. Качественное определение (полоски контроля и образца).



Продукты для определения (готовы или разрабатываются): *Mycobacterium Tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Helicobacter pylori*, Dengue virus, Enterovirus, Canine distemper Virus, Canine Parvovirus, *Toxoplasma Gondii*, *Acidovorax citrulli*, Cucumber mosaic virus, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Salmonella*, *Brucella*, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Caulimovirus 35s promoter/

Патенты:

NEMA (Nicking Enzyme Mediated Amplification), Application No.: 200610057262.7 (Published).

CPA (Cross Priming Amplification), Application No.: 200810134583.1 (Accepted).

**OptiGene Limited** (частная непубличная компания, основана в 2008 году, Великобритания)

Продукты компании – оборудование и расходные материалы для проведения изотермической ПЦР (LAMP – для ДНК и RT-LAMP для РНК), а также сервис по подбору праймеров.

Оборудование: приборы GenieII (16 пробирок, одна зона, детектор 510 нм, градиент температур, 2 кг, СЕ, объем образца: 10-150 мкл) и GenieIII (8 пробирок, 4 независимых зоны, детектор 2-канальный: 510-560 и >620 нм, градиент температур, автономный, 1.75 кг, СЕ, объем образца: 10-150 мкл).

Реагенты: мастер-миксы и полимеразы для проведения изотермической ПЦР для научных исследований. Линейка готовых наборов для определения патогенов в растениях. Формат – стандартные пробирки для ПЦР.

Использует патенты Eiken Chemical Co., Ltd.

Дистрибьютор в России – Интерлабсервис.

### **Illumina** (публичная компания, США)

Метод изотермической амплификации (Isothermal Bridge Amplification) – одна из основополагающих технологий всех технических решений, связанных с высокопроизводительным секвенированием компании. Он используется при формировании кластеров в проточной ячейке для NGS в станции cBot<sup>38</sup>. По данной технологии работают оборудование (и расходные материалы для него) – всё, кроме чиповых технологий (iScan).

Патент: US7972820B2 (Isothermal amplification of nucleic acids on a solid support, приоритет от 18.12.2000 г.).

В таблице представлены основные финансовые показатели компании за 2015-2017 гг. Более 50% продаж – США, Азия и Европа – около 20% каждый, остальной мир (включая) – менее 10%. Рост в США, Европе, Азии – 13-17%, в остальных регионах рост отсутствует.

**Таблица.** Продажи компании Illumina по регионам в 2015-2017 гг. в долларах США

Регион	2017			2016			2015	
	Выручка	Доля	Рост	Выручка	Доля	Рост	Выручка	Доля
США	1511	55%	17%	1294	54%	7%	1207	54%
Европа	632	23%	14%	553	23%	5%	527	24%
Азия	514	19%	13%	456	19%	20%	380	17%

<sup>38</sup> [https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet\\_cbot.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_cbot.pdf)

Другие рынки	95	3%	0%	95	4%	-10%	106	5%
Всего	2752		15%	2398		8%	2220	
Доход	606		3%	587		-4%	613	

Дистрибьютор в России – Альбиоген.

### **Grifols (Germany)**

Procleix – тесты для исследования патогенов HIV-1, HIV-2, HCV, HBV, WNV, Parvovirus B19, HAV, HEV, Dengue и Zika. Исполнение: ТМА-амплификация в классическом формате.

**TwistDx Ltd.** (ранее известная, как ASM Scientific Ltd) (Кембридж, Великобритания)<sup>39</sup>

Микрофлюидные чипы для определения резистентности к антибиотикам (технология амплификации RPA)<sup>40</sup>.

Также технология RPA используется в приложениях для исследования растительных патогенов, инфекционных заболеваний, ветеринарии.

### **ThermoFisher Scientific**

Продукция по технологии иПЦР представлена:

- реагенты для проведения LAMP-амплификации (полимераза Bsm DNA Polymerase)
- подготовка библиотек для секвенирования предполагает изотермическую амплификацию

### **Becton, Dickinson & Company (Германия)**

иПЦР представлена оборудованием и расходными материалами по технологии SDA (запуск – 2002 год) для исследования *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae*<sup>41</sup> (FDA – публикация<sup>42</sup>):

- BDProbeTec™ ET System

<sup>39</sup> <https://www.twistdx.co.uk/en/rpa>

<sup>40</sup> <https://www.twistdx.co.uk/en/innovation/microfluidics-lab-on-chip>

<sup>41</sup> [http://www.bd.com/contentmanager/b\\_article.asp?Item\\_ID=12501](http://www.bd.com/contentmanager/b_article.asp?Item_ID=12501)

<sup>42</sup> <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/TissueSafety/UCM177413.pdf>

- BD Viper™ Sample Processor

Формат – пробирки.

## 5. Исследования и разработки

Общее преимущество протоколов изотермической амплификации заключаются в скорости, кроме того, они не требуют использования сложных термоциклеров, имитируя репликацию ДНК в природных условиях (например, при температуре тела человека), что значительно упрощает использование, собственно, технологии, и разработку технических решений (например, амплификацию на подложке или в микрофлюидном потоке на чипе).

Миниатюризация систем диагностики требует создания “твердотельных” ДНК/РНК/миРНК-детектирующих систем, работающих при любых (адекватных) температурах. Одним из важнейших направлений развития микросистем выступают системы на основе амплификации с последующей или одновременной детекцией. Этот подход представлен, например в устройствах TwistDX<sup>43</sup> и Genie II<sup>44</sup> (OptiGene).

Возможен также подход, принципиально исключающий стадию амплификации из процесса анализа. Это возможно благодаря развитию высокочувствительных детекторов последовательностей нуклеиновых кислот. Заявлены как коммерчески доступные, такие системы, как NanoString<sup>45</sup> (Seattle, USA), Genefluidics<sup>46</sup> (Irwindale, USA), ExoCyte<sup>47</sup> (Reading, UK). Возможно, в будущем такие системы будут широко востребованы для анализа сложных клинических образцов<sup>48</sup>. Среди проблем подхода с прямой детекции нуклеиновых кислот – химическая сложность биологических образцов, достаточная для клиники специфичность и надёжность обнаружения, а также возможности для миниатюризации.

Для создания полноценной диагностической системы, необходимо интегрировать в одном небольшом пространстве систему внесения\процессинга образцов, амплификации и детекции результата.

Зародившись, как и классическая ПЦР в начале 1980х годов микрофлюидная технология объединилась с ней в начале 2000х или даже ранее в концепции лаборатории на чипе<sup>49 50</sup>. Логичным продолжением явилось использование более совершенных технологий

---

<sup>43</sup> Платформа для изотермической амплификации с параллельной флуориметрической детекцией.

<sup>44</sup> Портативное. Двухканальная флуориметрическая детекция 8 RPA реакций.

<sup>45</sup> <https://www.nanostring.com/scientific-content/technology-overview/ncounter-technology>

<sup>46</sup> <http://genefluidics.com/>

<sup>47</sup> [http://www.abic.ca/abic2010/html/speakers/PDF%20Web%20Presentations/Health\\_Tuesday\\_Frith\\_Graeme\\_400\\_430.pdf](http://www.abic.ca/abic2010/html/speakers/PDF%20Web%20Presentations/Health_Tuesday_Frith_Graeme_400_430.pdf) На данный момент нет сведений о положении компании

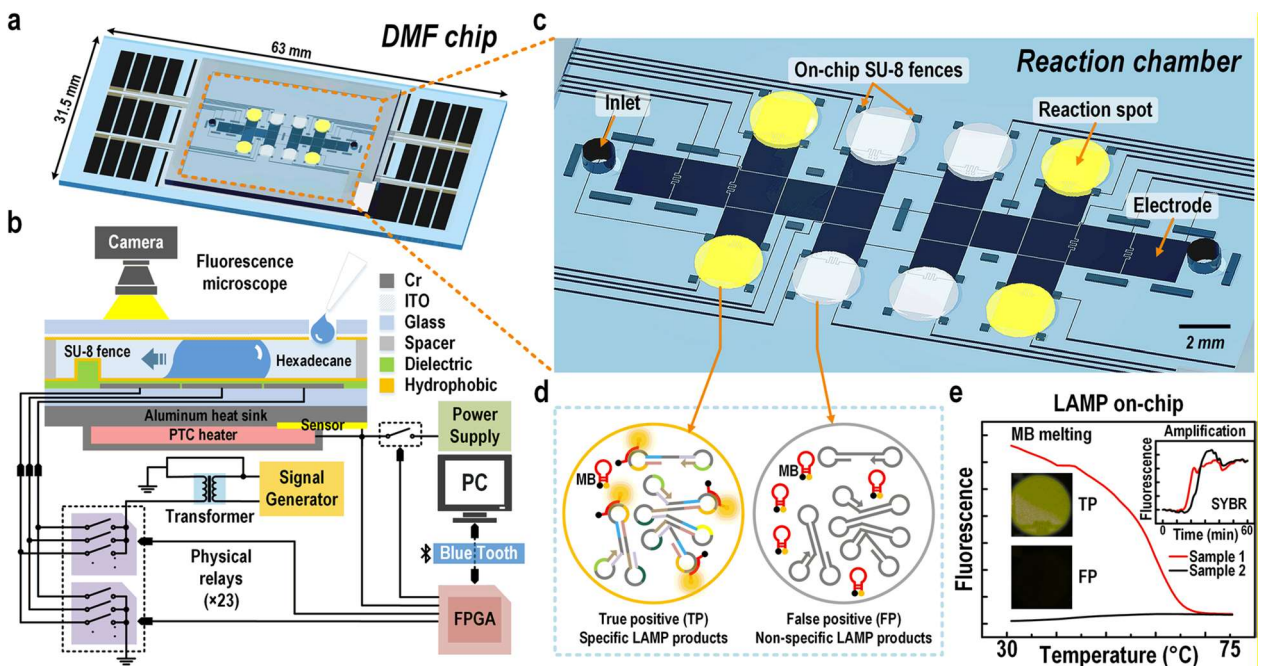
<sup>48</sup> <https://www.omicsonline.org/open-access/isothermal-amplification-and-quantification-of-nucleic-acids-and-its-use-in-microsystems-2157-7439-1000282.pdf>

<sup>49</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3297159/>

<sup>50</sup> Manz, A.; Graber, N.; Wildmer, H.M. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. Sens. Actuat. B Chem. 1990, 1, 240-248.



изотермических амплификации на микрофлюидных чипах<sup>51</sup>. Примером может служить цифровая микрофлюидная система (DMF-system) основанная на LAMP-технологии и предназначенная для обнаружения патогенов с использованием технологии ДНК-маяков (Molecular Beacon DNA probes). Для обнаружения с точностью порядка 10 копий на реакцию требуется 40 минут. В качестве плюсов технологии названы более высокая специфичность и снижение риска аэрозольной контаминации.



**Рисунок.** Микрофлюидная DMF-система на основе технологии LAMP<sup>52</sup>

В статье, опубликованной Coelho<sup>53</sup> в 2017 г., рассматриваются перспективы цифровой микрофлюидики в комбинации с LAMP-амплификацией. Такая комбинация способна дать ROC-решения, обеспечивающие простую, быструю и автоматическую амплификацию нуклеиновых кислот с исключительными возможностями интеграции. Утверждается что такой прибор дешёв в производстве и эксплуатации, однако конкретные финансовые данные не приведены.

Описан прототип прибора, обеспечивающего LAMP-амплификацию (смотрите описание технологий и ПЦР) 0.5 нг/мкл ДНК-мишени за 45 минут. Реакция проходит при температуре в 60 градусов Цельсия с вариацией в пределах трёх десятых градуса в объёме 1.5 мкл, что существенно способствует снижению расходов на реактивы. Авторы сообщают о снижении потребления реактивов в 40 000 раз и снижении предела обнаружения в 100 раз, а количество наработанной ДНК возрастает на 9 порядков при 50%-ном выигрыше во

<sup>51</sup> <https://www.nature.com/articles/s41598-017-14698-x>

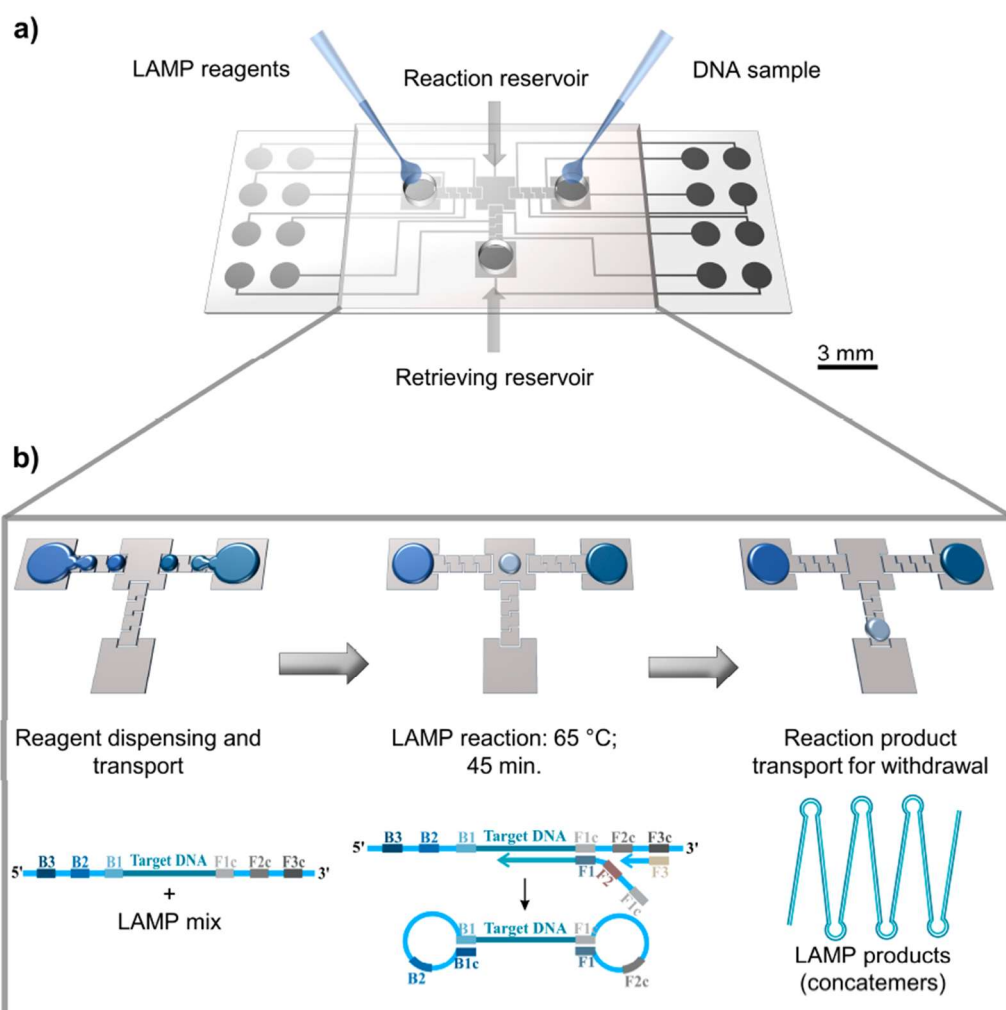
<sup>52</sup> <https://www.nature.com/articles/s41598-017-14698-x>

<sup>53</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29144379>



времени. Процесс может быть полностью автоматизирован. Помимо LAMP на чип может быть также интегрирован и процесс RPA (смотрите описание технологий и ПЦР).

Даже мобильные устройства рассматриваются в качестве возможного считывателя результатов LAMP<sup>54</sup>. Описана система для детекции SNP, биомаркеров с пределом обнаружения в сто геномных ДНК-копий, ошибкой менее 15% в течение 70 минут. Продукты амплификации гибридизовали с аллель-специфическими олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на микросхемах в формате микрочипов. Были проведены сортировка зондов, гибридизация и колориметрическое окрашивание в соответствии с авторским протоколом. Наиболее частое применение таких устройств – быстрая идентификация патогенов.



**Рисунок.** Комбинация цифровой микрофлюидики и LAMP-амплификации

<sup>54</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29558731>

Одним из интересных ответвлений технологий амплификации на миниатюрных устройствах являются “бумажные” носители для изотермической амплификации и детекции<sup>55</sup>.

Предложена бумажная микрофлюидика<sup>56</sup>. Первые попытки управления распределением жидкостей и разделением реакционных зон на бумаге в лабораторных целях берут начало в 1902 году. В 1937 году впервые применена импрегнация парафином для осуществления качественного точечного тестирования на бумаге, сформировав таким образом простейшее бумажное устройство. Впоследствии рассматривались также и бумажно-пластиковые варианты. Преимущества таких систем в случае успешной реализации достаточно очевидны. В случае применения бумажных систем возникает гибрид или дальнейшее развитие тест полоски латерального тока. Однако, в последних применяются по большей части иммунохимические методы<sup>57</sup>.

**Таблица. Патенты, описывающие тест-полоски**

Название патента\ авторы	Номер	Приоритет	Владелец
Test device and method for colored particle immunoassay\David E. Charlton	US6485982B1	27 июня 1988	Church and Dwight Co Inc\Armkel LLC

Недостатки бумажных систем с точки зрения ДНК-технологий: химическая нестойкость при соприкосновении с компонентами буфера, pH, температурой, особенности технологии изготовления, привели к задержке в развитии этой технологии несмотря на высокую чувствительность и специфичность, которые могут быть в теории достигнуты с её помощью, и дешевизну самого носителя. Бумажный носитель может быть дополнен и другими (например, пластиковыми) компонентами<sup>58</sup>.

Развитие систем детекции, например на базе CMOS технологии<sup>59</sup> также способно улучшить аналитические и потребительские качества устройств на базе изотермической амплификации, расширив круг их возможных приложений.

<sup>55</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28740546>

<sup>56</sup> <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/lc/c3lc50169h#!divAbstract>

<sup>57</sup> <https://www.abingdonhealth.com/contract-services/what-is-a-lateral-flow-immunoassay/>

<sup>58</sup> <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X17317883>

<sup>59</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27965010>

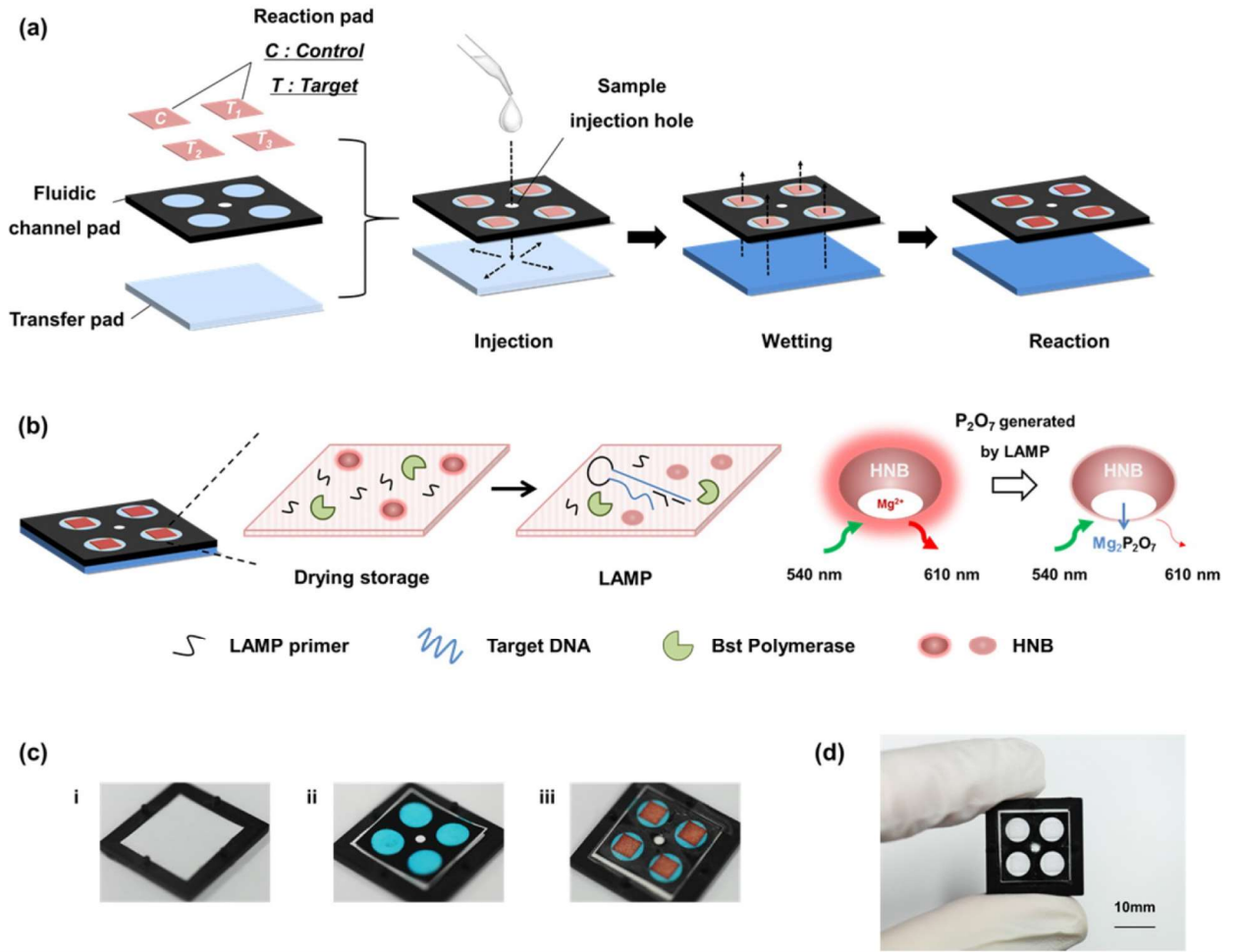
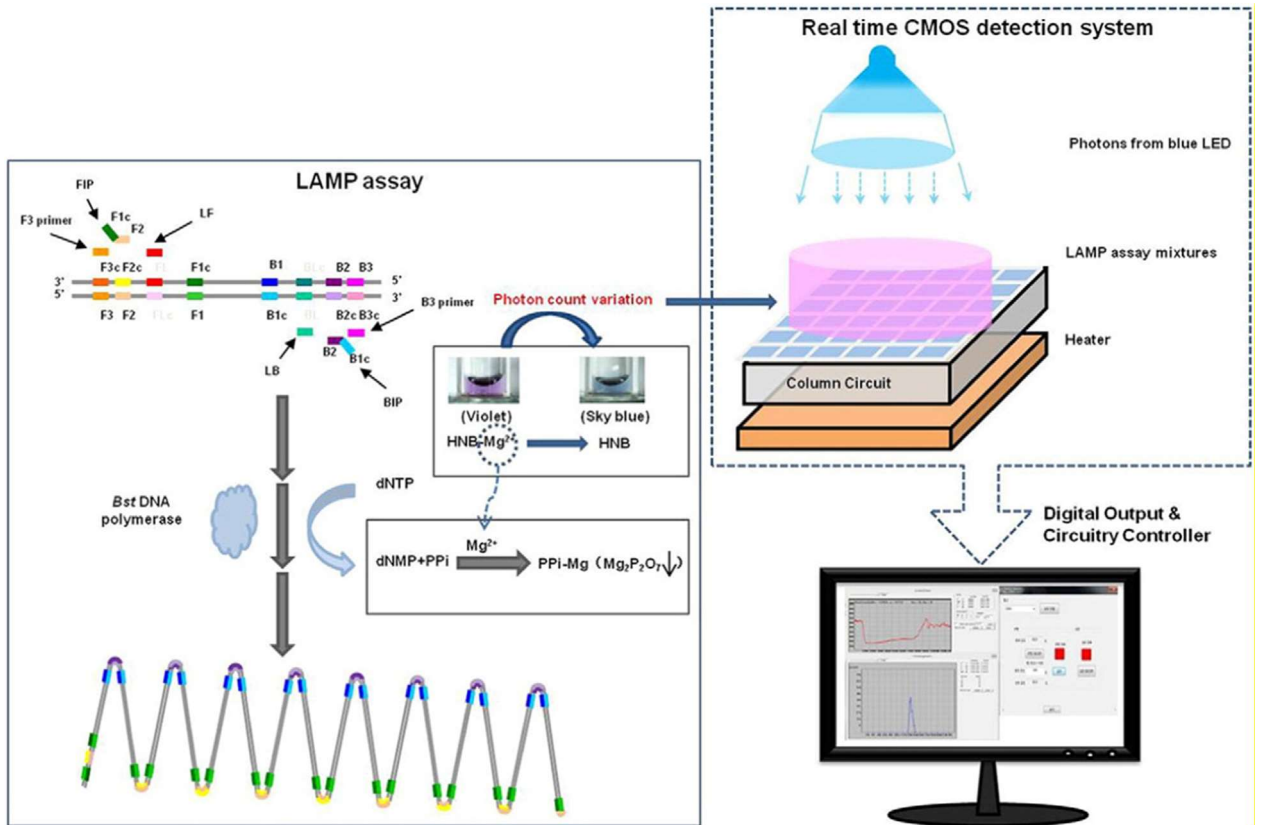


Рисунок. Технология на бумажных носителях



**Рисунок.** Количественная система на базе LAMP-технологии и CMOS-детектора для обнаружения пищевых патогенов.