










Ю.А. Никонова ✉ 
С.Г. Аббасова 
П.Е. Каргополова 
О.М. Стрижакова 
И.В. Лягоскин 
А.П. Васильев 
А.С. Першин 

Валидация методики оценки биологической активности лекарственного препарата на основе тоцилизумаба и определение критериев приемлемости результатов анализа

Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ»,
Владимирская ул., д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский р-н,
Владимирская обл., 601125, Российская Федерация

✉ Никонова Юлия Александровна; yanikonova@ibcgenerium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Для биоаналитических методик характерны большая вариабельность и меньшая устойчивость по сравнению с физико-химическими методиками в силу лабильности характеристик живых тест-систем. Поскольку в нормативных документах не определен единый подход к формированию перечня критериев пригодности системы и допустимых границ для полученных результатов, то их устанавливают на основании валидационных испытаний.

ЦЕЛЬ. Получить экспериментальное подтверждение соответствия методики оценки биологической активности лекарственного средства на основе разрабатываемого биоаналога тоцилизумаба (GNR-087) валидационным требованиям и определить количественные границы критериев пригодности аналитической системы и приемлемости результатов анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Биологическую активность биоаналога тоцилизумаба оценивали по ингибированию интерлейкин-6-зависимой секреции эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), продуцируемой клетками репортерной линии НЕК-Blue™ IL-6. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Prism 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Специфичность методики подтверждена дозозависимым ингибированием интерлейкин-6-зависимой секреции эмбриональной щелочной фосфатазы клетками при действии тоцилизумаба. Методика линейна, коэффициент детерминации линейной функции $R^2 \geq 0,99$. Прецизионность методики удовлетворительная, сходимость – от 2 до 9%, внутрилабораторная прецизионность – 9 и 14%. Коэффициенты выявления активности (R_c) модельных образцов с симулированной активностью от 60 до 140%, в том числе и «слепых проб», находились в диапазоне 80–120%. Теоретические значения относительной специфической активности (RP) находились внутри доверительных интервалов средних найденных значений RP , что подтвердило правильность методики. Подтверждена устойчивость методики к контролируемым изменениям: использованию репортерных клеток разных пассажей (коэффициент вариации (CV_{RP}) составил 10%), замене лотов ИЛ-6 ($CV_{RP}=1\%$) и реагента для детекции SEAP ($CV_{RP}=3\%$), при этом значение R_c находилось в диапазоне 80–120% от номинального значения RP .









ВЫВОДЫ. Методика оценки биологической активности биоаналога тоцилизумаба соответствует валидационным характеристикам, таким как правильность, линейность, прецизионность, специфичность и устойчивость к контролируемым изменениям. Установлены границы критериев пригодности системы и рассчитаны критерии приемлемости результатов биологического анализа. Разработанная методика может служить как для рутинного контроля биологической активности, так и для использования в исследованиях при доказательстве биоподобия разрабатываемых препаратов оригинальному (референтному) препарату, содержащему тоцилизумаб.

Ключевые слова: биологический анализ; специфическая активность; валидация аналитических методик; критерии приемлемости результатов анализа; критерии пригодности системы; тоцилизумаб; биологическая активность; интерлейкин-6

Для цитирования: Никонова Ю.А., Аббасова С.Г., Каргополова П.Е., Стрижакова О.М., Лягоскин И.В., Васильев А.П., Першин А.С. Валидация методики оценки биологической активности лекарственного препарата на основе тоцилизумаба и определение критериев приемлемости результатов анализа. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(3):317–329. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329>

Финансирование. Работа выполнена при спонсорской поддержке АО «ГЕНЕРИУМ».

Потенциальный конфликт интересов. Все авторы являются сотрудниками компании АО «ГЕНЕРИУМ». Существует потенциальный конфликт интересов в связи с финансированием данной научной работы АО «ГЕНЕРИУМ» и заинтересованностью последнего в результатах работы. Однако при написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных.

Yulia A. Nikonova  
Svetlana G. Abbasova 
Polina E. Kargopolova 
Olga M. Strizhakova 
Ivan V. Lyagoskin 
Alexandr P. Vasilev 
Andrey S. Pershin 

Validation of an Analytical Procedure for Evaluating the Biological Activity of a Medicinal Product Based on Tocilizumab and Determination of Acceptance Criteria for Test Results

GENERIUM JSC,
14 Vladimirskaaya St., Volginsky, Petushinskiy District, Vladimir Region 601125,
Russian Federation

✉ Yulia A. Nikonova; yanikonova@ibcgenerium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Bioanalytical techniques are characterised by greater variability and lower stability than physicochemical methods because live test systems are inherently labile. Since regulatory standards do not establish a unified approach, the selection of system suitability criteria and acceptance criteria for test results is based on validation studies.

AIM. This study aimed to validate an analytical procedure for evaluating the biological activity of a medicinal product based on the investigational tocilizumab biosimilar GNR-087 and determine the quantitative limits for system suitability criteria and acceptance criteria for test results.

MATERIALS AND METHODS. The biological activity of the investigational tocilizumab biosimilar was assessed by the inhibition of IL-6-induced secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) expression by HEK-Blue™ IL-6 cells. Statistical processing of the obtained results was performed using Prism 6.0 software.

RESULTS. The specificity of the analytical procedure was confirmed by the dose-dependent inhibition of IL-6-induced SEAP expression by cells observed with tocilizumab. The analytical procedure was linear, with a coefficient of determination $R^2 \geq 0.99$. The precision of the analytical procedure was satisfactory; its repeatability varied from 2 to 9%, and its intermediate precision was 14%. The recovery coefficients (R_c) for spiked samples simulating activity levels of 60–140%, including blinded samples, ranged from 80 to 120%. The theoretical values of relative potency (RP) were within the confidence intervals of the mean relative potency estimates, which confirmed the accuracy of the analytical procedure. The validation confirmed the robustness of the analytical procedure to controlled variations, including the use of reporter cells at different passages (with a coefficient of variation for relative potency estimates (CV_{RP}) of 10%), different IL-6 lots (with a CV_{RP} of 1%), and different SEAP detection reagent lots (with a CV_{RP} of 3%); the R_c remained in the range of 80–120% of the nominal RP value.

CONCLUSIONS. The analytical procedure for evaluating the biological activity of the investigational tocilizumab biosimilar meets the validation criteria, including accuracy, linearity, precision, specificity, and robustness. The study established

system suitability criteria and acceptable limits for biological assay results. This analytical procedure can be used both for routine biological activity control and for demonstrating the biosimilarity of new medicinal products to the original (reference) tocilizumab-based medicinal product.

Keywords: biological assay; potency; validation of analytical procedures; acceptance criteria for test results; system suitability criteria; tocilizumab; biological activity; interleukin-6

For citation: Nikonova Yu.A., Abbasova S.G., Kargopolova P.E., Strizhakova O.M., Lyagoskin I.V., Vasilev A.P., Pershin A.S. Validation of an analytical procedure for evaluating the biological activity of a medicinal product based on tocilizumab and determination of acceptance criteria for test results. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(3):317–329. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329>

Funding. The study reported in this paper was carried out with the financial support of GENERIUM JSC.

Disclosure. All the authors are employed by Generium JSC. There is a potential conflict of interest due to the financial support by GENERIUM JSC and the interest it takes in the study results. However, when writing this paper, the authors were guided by considerations of the scientific value of the material obtained and declare impartiality in their data assessment.

ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-6 (ИЛ-6) относится к цитокинам острой воспалительной фазы и участвует в регуляции функций иммунной, кроветворной, нервной и других систем организма. Показано значимое влияние ИЛ-6 на развитие ревматоидного артрита, пролиферацию опухолевых клеток при раке кишечника, поджелудочной железы, молочной железы, множественной миеломе и других онкологических заболеваниях [1]. Также описана стимулирующая роль ИЛ-6 в развитии «цитокинового шторма» при заболевании COVID-19 [2, 3]. Одним из способов терапии этих состояний является использование лекарственных средств (ЛС) на основе моноклональных антител (мАт), направленных на инактивацию ИЛ-6, в частности тоцилизумаба. Тоцилизумаб – это рекомбинантное гуманизированное мАт подкласса иммуноглобулинов IgG1, взаимодействующее с экстраклеточной частью мембраноассоциированных и растворимых форм рецептора ИЛ-6. Связывание тоцилизумаба блокирует взаимодействие рецептора с ИЛ-6 и таким образом ингибирует биологическое действие ИЛ-6 [4].

Критическим показателем качества любого биотехнологического ЛС, будь то гормоны, цитокины или моноклональные антитела, является специфическая биологическая активность¹. Биологические методики оценки специфической активности в условиях *in vitro* уникальны для каждого ЛС, поскольку результат анализа должен коррелировать с терапевтической эффективностью препарата [5].

Для оценки способности тоцилизумаба связываться со своей мишенью применяют такие методы, как иммуноферментный анализ (ИФА), поверхностный плазмонный резонанс или проточная цитометрия. Однако данные подходы отражают только первый этап механизма действия тоцилизумаба. Комплексно оценить активность ЛС можно с применением методик, основанных на использовании клеточных культур, которые отвечают на сигнал, запускаемый связыванием ИЛ-6 со своим рецептором, что позволяет количественно оценить функциональные свойства препарата. Так, например, можно использовать методы ИФА или проточной цитометрии, основанные на оценке ИЛ-6-индуцированного фосфорилирования сигнального транскрипционного белка STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), запускаемого связыванием ИЛ-6 со своим рецептором [6]. Недостатком таких подходов является их многоэтапность, что отрицательно влияет на прецизионность методик. Специфическую активность тоцилизумаба [6] предложено оценивать по антипролиферативному эффекту ЛС на ИЛ-6-зависимые клетки линии В-клеточной лимфомы DS-1 (ATCC® CRL-11102™). Однако нами был выбран подход с использованием репортерной линии клеток HEK-Blue™ IL-6. Связывание ИЛ-6 со своим рецептором на поверхности указанных клеток активирует янус-киназу и фосфорилирование STAT3, что запускает синтез секретируемой щелочной фосфатазы (secreted embryonic alkaline phosphatase, SEAP). Данная методика обладает рядом преимуществ:

¹ ICH Q6B Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. CPMP/ICH/365/96. EMA; 1999.

Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», глава 10 «Разработка, производство, установление характеристик и спецификации моноклональных антител и их производных».

- 1) демонстрирует специфичный дозозависимый ответ клеток на ИЛ-6;
- 2) отражает воспроизведение механизма передачи внутриклеточного сигнала после связывания ИЛ-6 с рецептором через фосфорилирование STAT3;
- 3) отличается относительной простотой выполнения.

Цель работы – получить экспериментальное подтверждение соответствия методики оценки биологической активности лекарственного средства на основе разрабатываемого биоаналогоа тоцилизумаба (GNR-087) валидационным требованиям и определить количественные границы критериев пригодности аналитической системы и приемлемости результатов анализа.

Для достижения поставленной цели необходимо было оценить специфичность, правильность, линейность в аналитическом диапазоне, прецизионность и устойчивость методики к внесению контролируемых изменений, установить количественные границы критериев пригодности аналитической системы и критериев приемлемости результатов анализа, что является неотъемлемой частью валидации методики и гарантией достоверности полученных с помощью этой методики результатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Как правило, при количественной оценке биологической активности анализируют не менее 6–8 серийных разведений стандартного (СО) и испытуемого образца (ИО), каждое разведение тестируют в 3–4 повторностях и аппроксимируют зависимость «доза – ответ» для каждого образца 4-параметрической функцией (4PL). В таких случаях специфическая активность определяется как отношение найденных значений полумаксимальных разведений или концентраций СО и ИО. В качестве критериев пригодности аналитической системы обычно устанавливают параметры для положительного и отрицательного контролей, а также для СО. Критерии приемлемости результатов анализа включают критерии для ИО. При обработке первичных данных необходимо использовать двухуровневую последовательную оценку их соответствия выбранным критериям. На первом этапе необходимо оценить соответствие первичных данных анализа критериям пригодности системы. Несовпадение данных на этом этапе означает, что полученные результаты следует признать недостоверными и повторить анализ.

Соблюдение критериев пригодности системы позволяет перейти ко второму этапу – оценке соответствия данных анализа критериям приемлемости для ИО. Расчет специфической активности ИО производят только в том случае, если первичные данные удовлетворяют критериям приемлемости результатов анализа².

При разработке методики в качестве критериев пригодности аналитической системы использовали следующие параметры:

- 1) разность средних значений оптической плотности (ОП) отрицательного (клетки в базовой среде) и положительного (клетки в среде для теста, содержащей ИЛ-6) контрольных образцов;
- 2) соотношение средних значений ОП максимального и минимального разведений образцов со средними значениями ОП отрицательного и положительного контрольных образцов соответственно;
- 3) коэффициент вариации ОП (CV_{OP} , %) для каждого разведения СО и контрольных образцов;
- 4) коэффициент детерминации (R^2) кривой зависимости ОП от логарифма разведений СО. Критерии оценки параллелизма включали:
- 5) соотношение углов наклона (slope);
- 6) соотношения верхних (top) и нижних (bottom) асимптот кривых зависимости «доза – ответ» СО и ИО [7, 8].

Критериями приемлемости для ИО являлись значения CV_{OP} для каждого разведения и R^2 кривой зависимости «доза – ответ».

Приготовление модельных образцов GNR-087.

Модельные образцы (МО) с различным содержанием GNR-087 готовили в среде для выполнения теста ДМЕМ/Ф12 (ООО НПП «ПанЭко», кат. № С470п), содержащей фетальную бычью сыворотку 10% об. (Capricorn Scientific GmbH, кат. № FBS-HI-11A), L-глутамин 2 мМ (ООО НПП «ПанЭко», кат. № Ф032), смесь пенициллина 100 ЕД/мл и стрептомицина 0,1 мг/мл (ООО НПП «ПанЭко», кат. № А075) и ИЛ-6 1 нг/мл (R&D Systems, кат. № 206-IL-010) согласно *таблице 1*. Каждый МО анализировали в 12 последовательных разведениях с шагом 1:3. Для МО с активностью 100% диапазон разведения по концентрации белка составил 1987,3–0,0112 нМ (кратность от 68 до 12045996).

Продолжительность полного аналитического цикла составляла 3 сут. На один планшет для анализа вносили разведения одного из МО с симулированной активностью от 60 до 140% (МО-ИО) и разведения МО с активностью 100%,

² ICH Q2(R1) Validation of analytical test procedures: text and methodology. CPMP/ICH/381/95. EMA; 1995.

ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

Таблица 1. Приготовление модельных образцов с симулированной активностью (разведение № 1 для анализа)

Table 1. Preparation of spiked samples with simulated biological activity (Test Dilution 1)

| Модельный образец (МО) <i>Spiked sample (SS)</i> | Активность МО, % <i>SS activity, %</i> | Объем внесенного GNR-087, мкл <i>GNR-087 spike volume, μL</i> | Объем среды для теста, мкл <i>Matrix volume, μL</i> |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| МО-ИО_60 <i>SS-TS_60</i> | 60 | 6 | 674 |
| МО-ИО_80 <i>SS-TS_80</i> | 80 | 8 | 672 |
| МО-СО/ИО_100 <i>SS-RS/TS_100</i> | 100 | 10 | 670 |
| МО-ИО_120 <i>SS-TS_120</i> | 120 | 12 | 658 |
| МО-ИО_140 <i>SS-TS_140</i> | 140 | 14 | 656 |

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. МО – модельный образец, СО – стандартный образец, ИО – испытуемый образец.

Note. SS, spiked sample; RS, reference standard; TS, test sample.

который использовали в качестве стандартного образца (МО-СО), а также положительные и отрицательные контрольные образцы. Каждый аналитический цикл состоял из трех этапов: 1) расев репортерных клеток на планшет, инкубация клеток; 2) внесение на планшет МО-СО, МО-ИО и контрольных образцов; 3) спектрофотометрическая оценка количества SEAP. В зависимости от вида валидационного испытания в течение одного аналитического цикла оценку количества SEAP проводили для одного или нескольких планшетов с независимо приготовленными разведениями МО-СО и МО-ИО.

Процедура анализа. Культивирование клеток HEK-Blue™ IL-6 (InvivoGen, кат. № hkb-hil6) проводили в базовой среде согласно инструкции производителя: ДМЕМ/Ф12, содержащая фетальную бычью сыворотку (10%), L-глутамин (2 мМ), пенициллин (100 ЕД/мл), стрептомицин (0,1 мг/мл) с добавлением Нормоцина™ (100 мкг/мл) (InvivoGen, кат. № ant-nr-05) и Селектиона™ (0,004% об.) (InvivoGen, кат. № hb-sel). Во всех валидационных испытаниях кроме тестирования методики по критерию «устойчивость к смене пассажа клеток» использовали клетки 6-го пассажа. В лунки плоскодонных 96-луночных планшетов вносили 100 мкл клеточной суспензии с концентрацией 200 тыс. кл./мл в базовой среде и инкубировали в CO₂-инкубаторе Galaxy 170S (Eppendorf) при температуре 37±1 °С, 5,0±0,5% CO₂ и 95% влажности (стандартные условия) в течение 20±2 ч. После инкубации в лунки вносили по 100 мкл одного из МО-ИО и разведения МО-СО. В лунки отрицательного контроля (К-) вносили по 100 мкл базовой среды, в лунки положительного контроля (К+) вносили по 100 мкл

среды для выполнения теста. МО-ИО и МО-СО тестировали в трех повторностях для каждого разведения, а отрицательный и положительный контрольные образцы – в шести повторностях. Инкубировали клетки с образцами в течение 24±1 ч в стандартных условиях, после чего вносили по 100 мкл реагента для детекции SEAP (InvivoGen, кат. № гер-qbs). Инкубировали в стандартных условиях в течение 60±5 мин и измеряли ОП на планшетном спектрофотометре Infinite M200 (Tecan Group Ltd) при длине волны 655 нм.

Статистическая обработка результатов.

Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 6.0, аппроксимируя зависимость значений ОП от десятичного логарифма величины, обратной разведению образца ($\lg 1/\text{dilution}$), функцией ингибирования 4PL. Значения полумаксимального ингибирующего разведения (ID_{50}) и R^2 для СО и ИО рассчитывали автоматически. Расчет средних значений ОП, стандартного отклонения (SD), значений $CV_{\text{оп}}$ и критериев пригодности системы проводили с использованием программы Microsoft Excel.

Полученные результаты сначала оценивали на соответствие критериям пригодности системы, а затем – критериям приемлемости результатов анализа для ИО.

Критерии пригодности системы:

- коэффициент детерминации R^2 дозозависимой кривой СО должен быть не менее 0,95;
- коэффициент вариации $CV_{\text{оп}}$ для каждого разведения СО, а также для положительного и отрицательного контрольных образцов не должен превышать 20%.

Критерии приемлемости результатов анализа для ИО:

- соотношение значений верхних асимптот дозозависимых кривых СО и ИО должно быть в пределах 0,8–1,25;
- соотношение значений нижних асимптот дозозависимых кривых СО и ИО должно быть в пределах 0,8–1,25;
- соотношение значений углов наклона дозозависимых кривых СО и ИО должно быть в пределах 0,8–1,25;
- коэффициент детерминации R^2 дозозависимой кривой ИО должен быть не менее 0,95;
- коэффициент вариации $CV_{оп}$ для каждого разведения ИО не должен превышать 20%.

При соблюдении критериев приемлемости для ИО рассчитывали значения относительной специфической активности (RP , %), используя формулу:

$$RP = \frac{ID_{50}(MO-CO_{100})}{ID_{50}(MO-IO_X)} \times 100\%, \quad (1)$$

где $ID_{50}(MO-CO_{100})$ – значение ID_{50} для МО со 100% активностью (СО);
 $ID_{50}(MO-IO_X)$ – значение ID_{50} для МО с симулированной активностью (ИО).

Правильность определения значения RP для тестируемой пробы – коэффициент выявления (recovery) – (Rc , %) вычисляли по формуле:

$$Rc = \frac{RP_{найд}}{RP_{теор}} \times 100\%, \quad (2)$$

где $RP_{найд}$ и $RP_{теор}$ – найденное и теоретическое значения относительной специфической активности препарата соответственно.

Оценивали следующие валидационные характеристики методики: специфичность, прецизионность, правильность, линейность и робастность (устойчивость).

Выполнение валидационных испытаний.

Специфичность методики определяли в одном аналитическом цикле, используя в качестве МО-ИО мАТ с другой специфичностью, но сходным строением Fc-фрагмента. Валидационные испытания по оценке прецизионности методики (повторяемости/сходимости и внутрилабораторной прецизионности между аналитиками и между днями) проводили в течение нескольких независимых аналитических циклов.

Сходимость оценивали по величине коэффициента вариаций значений RP (CV_{RP} , %), полученных

в трех независимых АЦ, проведенных каждым из аналитиков в течение короткого промежутка времени. Внутрилабораторную прецизионность между аналитиками оценивали по величине CV_{RP} , рассчитанной как среднее значение результатов, полученных двумя аналитиками в АЦ, проведенных одновременно. Внутрилабораторную прецизионность между днями также оценивали по величине CV_{RP} каждого МО-ИО с симулированной активностью от 60 до 140%, полученной в разных аналитических циклах каждым аналитиком.

Правильность методики оценивали на МО с симулированной активностью в диапазоне от 60 до 140% номинальной активности (не менее пяти МО-ИО). Методику считали соответствующей критерию «правильность», если значения, принимаемые за истинные ($RP_{теор}$), лежали внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов, полученных экспериментально ($RP_{найд}$)³. Дополнительно для оценки правильности методики каждым аналитиком был проведен аналитический цикл с образцом с неизвестной симулированной активностью («слепая проба»).

Линейность методики в аналитическом диапазоне (60–140% активности) проверяли с использованием пяти МО-ИО с симулированной активностью. Для оценки линейности строили график линейной регрессии $RP_{найд}$ от $RP_{теор}$ и график остатков.

Оценку устойчивости методики проверяли, внося в аналитическую систему контролируемые изменения: 1) использование клеток разных пассажей (от 6 до 10); 2) использование ИЛ-6 двух разных лотов; 3) использование реагента для детекции SEAP двух разных лотов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На этапе разработки методики были подобраны оптимальные условия проведения анализа – концентрация ИЛ-6 и диапазон разведений GNR-087, количество клеток на лунку, время инкубации и др. В качестве основных критериев рассматривали характеристики дозозависимой кривой 4PL, соответствующие следующим требованиям:

- диапазон разведений тоцилизумаба должен давать размах значений ОП от уровня значений ОП положительного контрольного образца (К+, среда для выполнения теста) до уровня значений ОП отрицательного контрольного образца (К–, базовая среда),

³ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

при этом значения ОП при минимальном и максимальном разведении ЛС должны быть близки к значениям К⁻ и К⁺ соответственно;

- дозозависимая кривая должна быть симметричной, при этом на верхней и нижней асимптотах должно быть не менее 3-х точек и не менее 3-х точек должно находиться на линейной части кривой [5].

Типичная дозозависимая кривая представлена на *рисунке 1*.

При определении специфичности методики использовали омализумаб (серия AVXS257506, «Новартис Фарма АГ»), поскольку омализумаб, как и тоцилизумаб, относится к подклассу IgG1 антител, но имеет другую специфичность и не способен связывать рецептор ИЛ-6. Омализумаб вносили в аналитическую систему в концентрациях, соответствующих концентрациям тоцилизумаба в разведениях МО-ИО_100, при этом разведения тоцилизумаба использовали как СО, а разведения омализумаба как ИО. Результаты считали приемлемыми, если критерии пригодности системы были соблюдены и наблюдалось дозозависимое ингибирование тоцилизумабом ИЛ-6-зависимой секреции SEAP, а при действии омализумаба ингибирование отсутствовало. Полученные результаты подтвердили специфичность методики (*рис. 2*).

Прецизионность методики определяют по близости результатов, получаемых одним аналитиком в нескольких аналитических циклах, проведенных в течение короткого промежутка

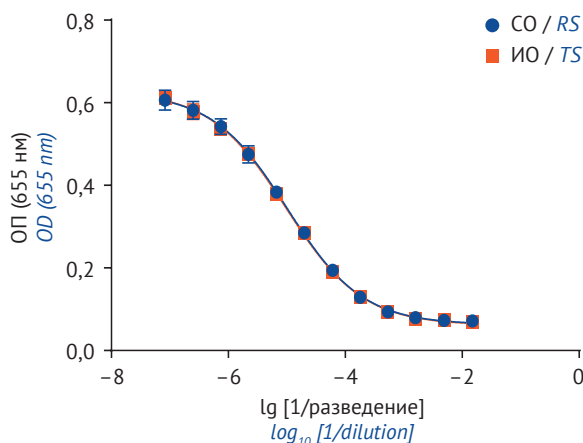


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Зависимость оптической плотности (ОП) от логарифма разведений тоцилизумаба в стандартном (СО) и испытуемом (ИО) образцах

Fig. 1. Optical density (OD) as a function of log dilution of tocilizumab for the reference standard (RS) and the test sample (TS)

времени (сходимость, повторяемость) и (или) разными аналитиками в разные дни (промежуточная, внутрилабораторная прецизионность)⁴. Методику считали соответствующей критериям прецизионности, если CV_{RP} для каждого МО-ИО не превышал 20%.

Тестирование методики по показателям «сходимость» и «внутрилабораторная прецизионность между аналитиками» проводили два аналитика с использованием МО-ИО_100. Разброс значений RP , полученный в испытаниях «сходимость» и «внутрилабораторная прецизионность между аналитиками», представлен на *рисунке 3*.

В испытании сходимости средние значения $RP \pm SD$ составили $102 \pm 9\%$ и $107 \pm 4\%$ у аналитиков 1 и 2. CV_{RP} между аналитическими циклами аналитиков 1 и 2 был 8 и 4% соответственно. При тестировании «воспроизводимости между аналитиками» $RP \pm SD$ были равны $105 \pm 0,7\%$, $111 \pm 1,4\%$ и $99 \pm 8,5\%$ в аналитических циклах 1–3. Значения CV_{RP} составили 1% в аналитических циклах 1–2 и 9% в аналитическом цикле 3.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности между днями каждым аналитиком было протестировано по пять ИО-МО с симулированной активностью от 60 до 140%. Было выполнено по три независимых аналитических цикла с каждым МО-ИО с разницей в несколько дней. Разброс значений $RP_{найд}$

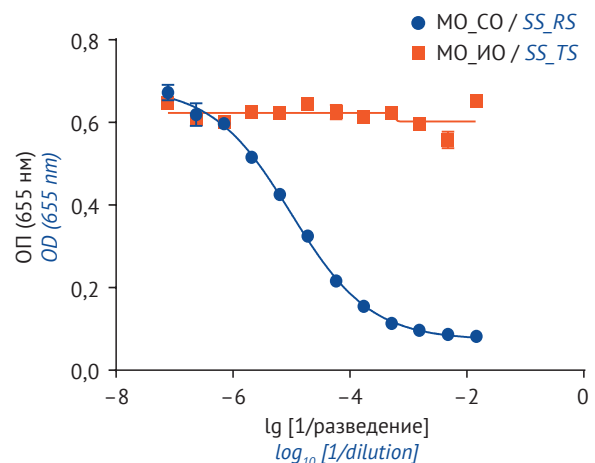


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 2. Зависимость оптической плотности (ОП) от логарифма разведений тоцилизумаба (стандартный образец, МО_СО) и омализумаба (испытуемый образец, МО_ИО) при определении специфичности методики

Fig. 2. Optical density (OD) as a function of log dilution of tocilizumab (reference standard, SS_RS) and omalizumab (test sample, SS_TS)

⁴ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методов. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

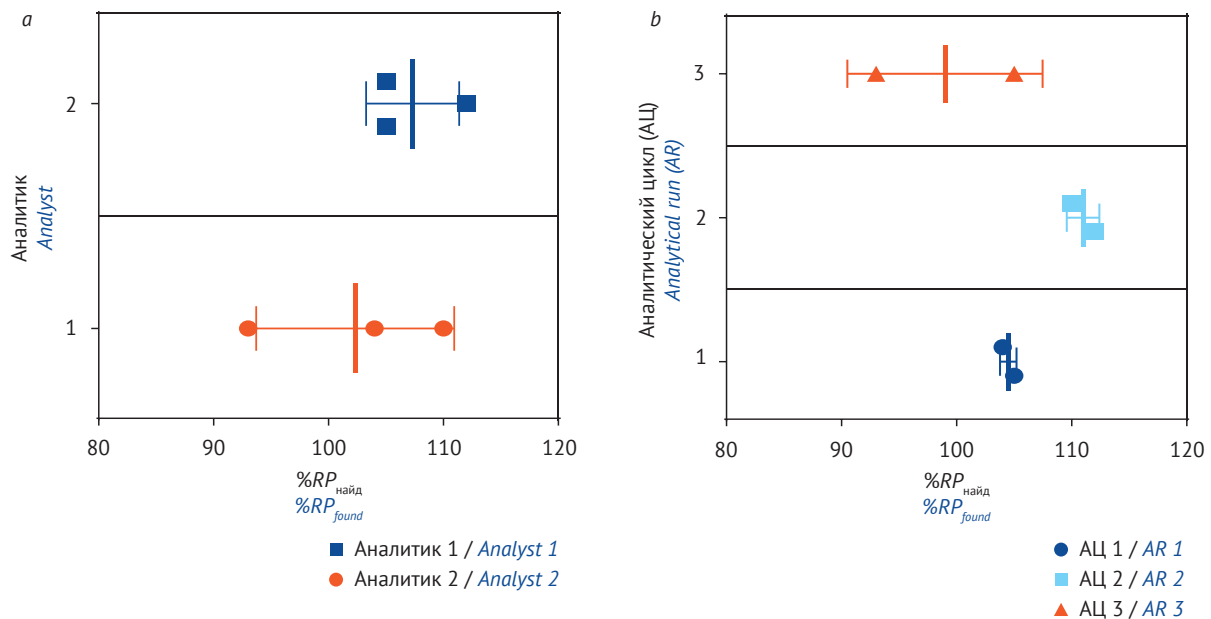


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 3. Разброс значений относительной специфической активности (RP), полученных при тестировании методики по критериям: а – сходимость, б – «воспроизводимость между аналитиками». АЦ – аналитический цикл

Fig. 3. Scatter of relative potency values (RP) measured in analytical procedure validation for: a, repeatability, and b, intermediate precision (different analysts). AR, analytical run

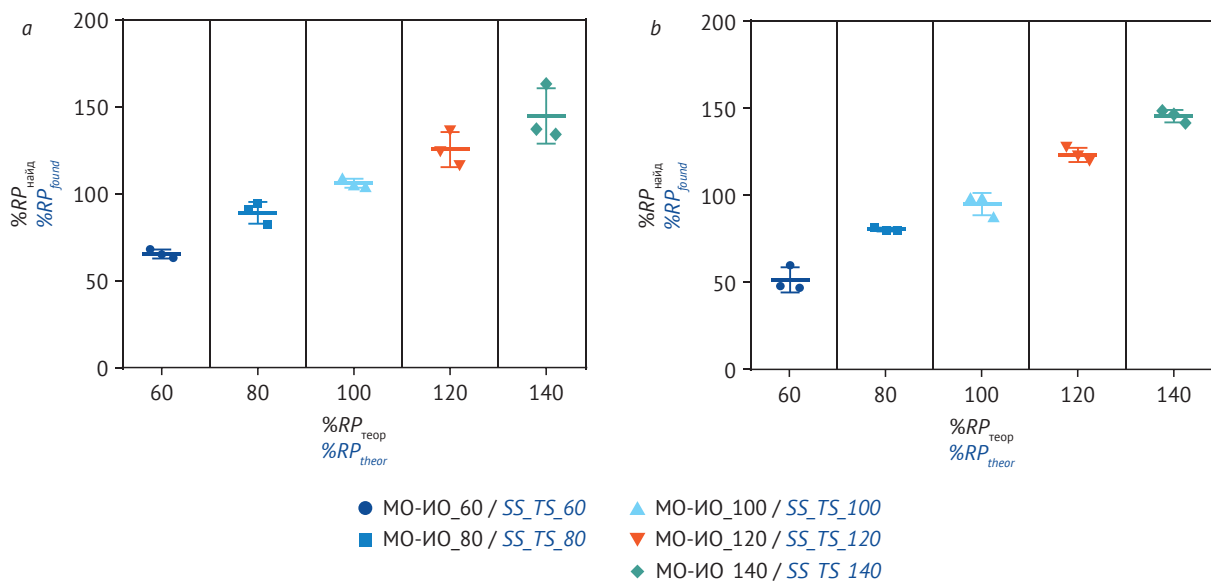


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 4. Разброс значений относительной специфической активности (RP), полученных при тестировании методики по критерию «воспроизводимость между днями»: а – результаты аналитика 1, б – результаты аналитика 2. МО-ИО_N – испытуемый образец с симулированной активностью N

Fig. 4. Scatter of relative potency values (RP) measured in analytical procedure validation for intermediate precision (different days): a, Analyst 1, and b, Analyst 2. SS_TS_N, test sample simulating activity N

в испытании внутрилабораторной прецизионности между днями представлен на рисунке 4. Средние значения RP, SD и CV_{RP} представлены в таблице 2 «Средние значения относительной

специфической активности и коэффициенты вариации полученные двумя аналитиками в тесте «воспроизводимость между днями», опубликованной на сайте журнала⁵.

⁵ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table2>

При оценке внутрилабораторной прецизионности максимальное значение CV_{RP} составило 9% для прецизионности между аналитиками и 14% для прецизионности между днями. Полученные результаты соответствовали требованиям, предъявляемым к прецизионности методики.

Под правильностью методики понимают близость полученных значений к значениям, принимаемым за истинные. Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации валидируемая методика соответствует критерию «правильность», если значения, принимаемые за истинные ($RP_{теор}$), лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике ($RP_{найд}$)⁶. В нормативных документах нет четких указаний к определению правильности клеточных тестов для оценки специфической активности биологических ЛС. В своей работе мы опирались на рекомендации для методик, основанных на оценке связывания лиганда (ligand-binding assay, LBAs), как наиболее близких к клеточным тестам. Согласно рекомендациям⁷, разброс значений между тестируемым и номинальным значением измеряемого показателя не должен превышать 20%. Для образцов нижнего (НПКО) и верхнего (ВКПО) пределов количественного определения разброс значений может возрастать до 25%⁸. То есть значение коэффициента R_{sc} , вычисленного по формуле 2, для тестируемой пробы должно находиться в диапазоне 80–120%, а в случае НПКО и ВКПО – в диапазоне 75–125%. В описанной методике МО-ИО_60 рассматривали как НПКО, а МО-ИО-140 как ВКПО, поэтому разброс значений (CV_{Rc}) допускался до 25%, для остальных МО-ИО CV_{Rc} не должен был превышать 20%.

Результаты валидационных испытаний по критерию «правильность» считали приемлемыми, если соблюдались следующие условия:

- значение R_c для МО с симулированной активностью от 80 до 120% должно находиться в диапазоне от 80 до 120% включительно;
- значение R_c для МО с симулированной активностью 60 и 140% должно быть в диапазоне от 75 до 125% включительно;

- значения R_c для «слепой пробы» должны находиться в диапазоне от 80 до 120% или от 75 до 125% включительно;
- теоретические значения RP должны находиться внутри доверительных интервалов средних найденных значений RP .

Средние значения R_c , SD_{Rc} , CV_{Rc} , а также границы 95% доверительных интервалов (95% ДИ) для каждого МО-ИО с симулированной активностью представлены в *таблице 3 «Результаты валидационных испытаний на соответствие методики критерию “правильность” с использованием модельных образцов»*⁹, результаты тестирования «слепой пробы» – в *таблице 4 «Результаты валидационных испытаний на соответствие методики критерию “правильность” с использованием “слепой пробы”*», опубликованных на сайте журнала¹⁰. Значения R_c МО-ИО с симулированной активностью от 60 до 140%, в том числе результатов анализа «слепой пробы», находились в диапазоне 80–120% от номинальной активности.

Соответствие полученных данных установленным требованиям к критерию «правильность» позволило нам сделать вывод, что разработанная методика характеризуется приемлемой правильностью в аналитическом диапазоне от 60 до 140% номинальной активности препарата.

Для подтверждения линейной зависимости аналитического сигнала от количества определяемого вещества в пределах аналитической области методики¹¹ строили графики линейной регрессии и графики остатков, аппроксимируя значения измеренной активности препарата ($RP_{найд}$) от ожидаемой величины ($RP_{теор}$) в МО с симулированной активностью от 60 до 140%. Определение линейности методики проводили, используя данные, полученные в испытаниях «воспроизводимости между днями». Считали, что методика соответствует критерию «линейность» при соблюдении следующих условий:

- значение R^2 должно быть не менее 0,95 ($R^2 \geq 0,95$);
- значение коэффициента k в уравнении линейной регрессии $y=kx \pm b$ должно быть в диапазоне $0,8 \leq k \leq 1,2$;
- график остатков должен носить случайный характер распределения.

⁶ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

⁷ Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. EMA; 2011.

Bioanalytical method validation. Guidance for industry. FDA; 2018.

ICH M10 on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/ICH/172948/2019 EMA; 2023.

⁸ Там же.

⁹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table3>

¹⁰ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table4>

¹¹ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

Значение коэффициента R^2 составило 0,9973 для результатов аналитика 1, и 0,9916 – у аналитика 2. Уравнение линейной зависимости по результатам аналитика 1 было выражено как $y=0,9800x+8,00$ и у аналитика 2 как $y=1,155x-15,90$. По усредненным результатам двух аналитиков $y=1,060x-3,000$. Графики остатков демонстрировали случайный характер распределения. Таким образом, было показано, что методика характеризуется приемлемой линейностью в аналитическом диапазоне от 60 до 140% номинальной активности препарата.

Для анализа устойчивости методики при вероятных небольших отклонениях от оптимальных условий проведения анализа¹² тестировали возможные изменения критичных компонентов биоаналитической системы: 1) другой пассаж репортерных клеток; 2) другой лот ИЛ-6; 3) другой лот реагента для детекции SEAP.

Для оценки влияния пассажа клеток на определение RP проводили три независимых аналитических цикла с использованием клеток 6-го, 7-го и 10-го пассажей. Для анализа влияния лота ИЛ-6 было выполнено по одному независимому аналитическому циклу для каждого лота. По аналогии с ИЛ-6 было проверено влияние лота реагента для детекции SEAP. Все аналитические циклы в исследовании устойчивости были проведены одним аналитиком с использованием МО-ИО₁₀₀. Методику считали устойчивой, если при смене компонентов аналитической системы значение R_c для МО₁₀₀ находилось в интервале от 80 до 120%, а CV_{Rc} не превышал 20%.

При использовании клеток 6, 7 и 10-го пассажей R_c составлял 115, 105 и 110% соответственно, CV_{Rc} составлял 5%. При замене лотов ИЛ-6 R_c составлял 97 и 96% для лота 1 и 2 соответственно, а CV_{Rc} был равен 1%. Значения R_c при использовании лотов 1 и 2 реагента для детекции SEAP были равны 97 и 93%, CV_{Rc} между этими значениями – 3%.

Поскольку значения R_c при изменении перечисленных компонентов системы находились в пределах от 80 до 120%, CV_{Rc} не превышал 20%, был сделан вывод об устойчивости методики при использовании диапазона пассажа клеток с 6 по 10 и при замене лотов ИЛ-6 и реагента для детекции SEAP.

Расчет критериев приемлемости результатов.

До начала валидационных испытаний нами были разработаны предварительные (установленные до анализа) критерии пригодности системы

и критерии приемлемости результатов анализа для ИО, а также установлены их допустимые значения. Результаты, полученные в испытаниях, были статистически обработаны, и для каждого критерия были установлены предельно допустимые значения (табл. 5).

Систему считали пригодной, если R^2 кривой СО был выше или равен 0,95, а $CV_{оп}$ для каждого разведения СО, положительного и отрицательного контрольных образцов не превышал 20%. Минимальное значение R^2 СО составило 0,9965, а максимальное значение $CV_{оп}$ СО, (К+) и (К-) было 15%. По результатам валидационных испытаний нижнюю границу R^2 СО оставили на значении 0,95, а верхнюю границу $CV_{оп}$ СО, (К+) и (К-) снизили до 15% (табл. 5).

Расчет RP МО-ИО проводили, если первичные результаты тестирования ИО соответствовали критериям приемлемости результатов для ИО. Критерии включали в себя оценку параллелизма дозозависимых кривых СО и ИО, а также минимального значения R^2 ИО и максимального значения $CV_{оп}$ разведений ИО. Дозозависимые кривые СО и ИО считали параллельными, если соотношения значений верхних и нижних асимптот находились в диапазоне 0,8–1,25, а соотношение углов наклона – в диапазоне 0,7–1,25. При этом значение R^2 ИО должно было быть не ниже 0,95, а $CV_{оп}$ для каждого разведения ИО – не выше 20%. Средние значения соотношений асимптот $\pm 3SD$ составили $1,02 \pm 0,16$ для верхних асимптот, для нижних асимптот $0,99 \pm 0,07$ и для углов наклона $1,01 \pm 0,15$. Параллелизм дозозависимых кривых СО и ИО был подтвержден. Минимальное значение R^2 ИО было 0,9967, максимальное значение $CV_{оп}$ ИО – 14%. Границы критериев параллелизма дозозависимых кривых и минимальное значение R^2 ИО оставлены без изменений, а верхняя граница $CV_{оп}$ разведений ИО снижена до 15%.

Однако более полная характеристика правильности работы системы в каждом аналитическом цикле требует расширения перечня критериев ее пригодности. Поскольку в основе методики лежит дозозависимый ответ репортерных клеток HEK-Blue™ IL-6 на ИЛ-6, дополнительные критерии пригодности системы должны характеризовать этот ответ. К таким характеристикам относили: 1) подтверждение активирующего действия ИЛ-6 на индукцию щелочной фосфатазы и отсутствие ИЛ-6-независимой секреции; 2) полное ингибирование сигнала ИЛ-6 при инкубации клеток HEK-Blue™ IL-6 с минимальными

¹² Там же.

Таблица 5. Сводная таблица рассчитанных критериев приемлемости результатов анализа

Table 5. Summary table of calculated acceptance criteria for test results

| Показатель <i>Parameter</i> | Предварительное значение критерия <i>Preliminary criteria</i> | Принцип установления критерия <i>Setting principle</i> | Установленные границы <i>Established limits</i> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Критерии пригодности системы <i>System suitability criteria</i> | | | |
| $\frac{\overline{OD}_{K+} - \overline{OD}_{K-}}{\overline{OD}_{K+} + \overline{OD}_{K-}}$ | Не определено <i>Not determined</i> | Не ниже минимального <i>NLT minimum</i> | ≥0,31 |
| $\frac{\overline{OD}_{\text{минимальные разведения CO}}}{\overline{OD}_{K+}}$ $\frac{\overline{OD}_{RS \text{ minimum dilution}}}{\overline{OD}_{K+}}$ | Не определено <i>Not determined</i> | Не выше максимального <i>NMT maximum</i> | ≤1,0 |
| $\frac{\overline{OD}_{\text{максимальные разведения CO}}}{\overline{OD}_{K-}}$ $\frac{\overline{OD}_{RS \text{ maximum dilution}}}{\overline{OD}_{K-}}$ | Не определено <i>Not determined</i> | Не ниже минимального <i>NLT minimum</i> | ≥0,72 |
| $\frac{\overline{OD}_{\text{верхняя асимптота CO}} - \overline{OD}_{\text{нижняя асимптота CO}}}{\overline{OD}_{RS \text{ upper asymptote}} + \overline{OD}_{RS \text{ lower asymptote}}}$ | Не определено <i>Not determined</i> | Не ниже минимального <i>NLT minimum</i> | ≥0,42 |
| Коэффициент вариации ОП СО, (K+) и (K-), % <i>Coefficient of variation for RS OD values, (K+) and (K-), %</i> | Не определено <i>Not determined</i> | Не выше максимального <i>NMT maximum</i> | ≤15 |
| Коэффициент детерминации (R ²) СО, % <i>RS coefficient of determination (R²), %</i> | Не менее 0,95 <i>NLT 0.95</i> | Не ниже минимального <i>NLT minimum</i> | ≥0,95 |
| Критерии приемлемости результатов анализа для ИО <i>Acceptance criteria for TS testing results</i> | | | |
| Соотношение значений верхних асимптот СО и ИО <i>Correlation of RS and TS upper asymptote values</i> | 0,8–1,25 | Среднее±3SD <i>Mean±3SD</i> | 0,86–1,18 |
| Соотношение значений нижних асимптот СО и ИО <i>Correlation of RS and TS lower asymptote values</i> | 0,8–1,25 | Среднее±3SD <i>Mean±3SD</i> | 0,92–1,06 |
| Соотношение значений углов наклона СО и ИО <i>Correlation of RS and TS slope values</i> | 0,8–1,25 | Среднее±3SD <i>Mean±3SD</i> | 0,86–1,16 |
| Коэффициент вариации ОП ИО, % <i>Coefficient of variation for TS OD values, %</i> | Не определено <i>Not determined</i> | Не выше, чем среднее±3SD <i>NMT mean±3SD</i> | ≤15 |
| Коэффициент детерминации (R ²) ИО, % <i>TS coefficient of determination (R²), %</i> | Не менее 0,95 <i>NLT 0.95</i> | Не ниже минимального <i>NLT minimum</i> | ≥0,95 |

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. $\overline{OD}(X)$ – среднее значение плотности соответствующего образца «X», K+ и K- – положительный и отрицательный контрольные образцы соответственно, СО – стандартный образец, ИО – испытуемый образец, SD – стандартное отклонение.

Примечание. $\overline{OD}(X)$, mean optical density of the corresponding sample (X); K+, positive control; K-, negative control; RS, reference standard; TS, test sample; SD, standard deviation; NMT, not more than; NLT, not less than.

разведениями СО; 3) отсутствие ингибирования при инкубации с максимальными разведениями СО; 4) разницу средних значений ОП верхней и нижней асимптот СО.

Для подтверждения активирующего действия ИЛ-6 и отсутствия спонтанной секреции рассчитывали разницу между средними значениями ОП положительного и отрицательного контрольных образцов (\overline{OD}_{K+} и \overline{OD}_{K-}). Полное ингибирование сигнала ИЛ-6 тоцилизумабом определяли

по отношению средних значений ОП лунок с максимальным разведением СО к средним значениям лунок \overline{OD}_{K-} , а отсутствие ингибирующего действия – по отношению средних значений ОП лунок с минимальным разведением СО к средним значениям лунок \overline{OD}_{K+} . Также для подтверждения ингибирующего действия тоцилизумаба в зависимости от дозы рассчитывали разницу средних значений ОП верхних и нижних асимптот СО.

Минимальное значение разницы средних значений ОП_{к+} и ОП_{к-} составило 0,31. Максимальное значение соотношения средних значений ОП лунок минимального разведения СО и К+ было равным 1,0, а минимальное значение соотношения средних значений ОП лунок максимального разведения СО и К- составляло 0,72. Минимальное значение разницы ОП лунок максимального (верхняя асимптота) и минимального (нижняя асимптота) разведений составляло 0,42. Полученные значения были приняты в качестве границ критериев пригодности системы (табл. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлены результаты валидации методики определения специфической активности GNR-087 с использованием репортерной клеточной линии НЕК-Blue™ IL-6, а также расчет количественных границ критериев пригодности системы и критериев приемлемости результатов анализа. Показано, что количественные границы критериев по мере накопления дополнительных данных могут быть ужесточены.

Валидационные испытания подтвердили, что разработанная методика оценки биологической активности лекарственных средств на основе тоцилизумаба, основанная на ингибировании ИЛ-6 зависимой секреции эмбриональной щелочной фосфатазы SEAP, измеряемой спектрофотометрически, обладает приемлемой специфичностью, правильностью, повторяемостью, внутрилабораторной прецизионностью и линейностью в аналитическом диапазоне от 60 до 140% от номинальной активности препарата.

Специфичность методики подтверждена дозозависимым ингибированием тоцилизумабом ИЛ-6-зависимой секреции SEAP и отсутствием ингибирования при действии омализумаба. Методика прецизионна – вариабельность результатов при исследовании сходимости составила 8 и 4% соответственно у аналитиков 1 и 2 и 14% при исследовании «воспроизводимости между аналитиками». Подтверждена правильность методики – значение коэффициента выявления (R_c) модельных образцов со симулированной активностью в диапазоне от 60 до 140% и «слепых проб» находились в диапазоне от 80 до 120%, а теоретические значения относительной специфической активности (RP) находились внутри доверительных интервалов средних найденных значений RP . Методика линейна, что подтверждено значениями коэффициента детерминации $R^2 \geq 0,99$, значение коэффициента k в уравнении линейной регрессии находилось в диапазоне от 0,8 до 1,2 и графики остатков демонстрировали случайный характер распределения. Показана устойчивость методики к использованию репортерных клеток разных пассажей (от 6-го до 10-го) ($CV_{RP} = 10\%$), замене лотов ИЛ-6 ($CV_{RP} = 1\%$) и реагента для детекции SEAP ($CV_{RP} = 3\%$), при этом значение R_c во всех случаях находилось в диапазоне 80–120% от номинального значения RP .

Разработанная методика может служить как для рутинного контроля биологической активности, так и для использования в исследованиях при доказательстве биоподобия разрабатываемых препаратов оригинальному (референтному) препарату на основе тоцилизумаба.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones S. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol.* 2006;80(2):227–36. <https://doi.org/10.1189/jlb.1105674>
- Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, et al. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum.* 2008;58(10):2968–80. <https://doi.org/10.1002/art.23940>
- Насонов ЕЛ. Иммунопатология и иммунофармакотерапия коронавирусной болезни 2019 (COVID-19): фокус на интерлейкин 6. *Научно-практическая ревматология.* 2020;58(3):245–61. Nasonov EL. Immunopathology and immunopharmacotherapy of coronavirus disease 2019 (COVID-19): focus on interleukin 6. *Rheumatology Science and Practice.* 2020;58(3):245–61 (In Russ.). <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2020-245-261>
- Sebba A. Tocilizumab: The first interleukin-6-receptor inhibitor. *Am J Health Syst Pharm.* 2008;65(11):1413–8. <https://doi.org/10.2146/ajhp070449>
- White J, Abodeely M, Ahmed S, Debaube G, Johnson E, Meyer D, et al. Best practices in bioassay development to support registration of biopharmaceuticals. *Biotechniques.* 2019;67(3):126–37. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0031>
- Miao S, Fan L, Zhao L, Ding D, Liu X, Wang H, Tan WS. Physicochemical and biological characterization of the proposed biosimilar tocilizumab. *Biomed Res Int.* 2017;2017:4926168. <https://doi.org/10.1155/2017/4926168>
- Robinson J, Sadick M, Deming S, Estdale S, Bergelson S, Little L. Assay acceptance criteria for multiwell-plate-based biological potency assays. *BioProcess Int.* 2014;12(1):30–41.
- Little TA, Harding DS. Establishing systems suitability and validity criteria for analytical methods and bioassays. *BioPharma Outsourcing Innovation, Pharmaceutical Technology* (February 2022). <https://www.pharmtech.com/view/establishing-systems-suitability-and-validity-criteria-for-analytical-methods-and-bioassays>

Дополнительная информация. На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещены таблицы 2–4.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table2>

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table3>

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table4>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Ю.А. Никонова – выполнение валидационных испытаний, анализ полученных результатов, расчет критериев приемлемости, написание текста рукописи; С.Г. Аббасова – разработка концепции исследования, анализ полученных результатов, расчет критериев приемлемости, написание и редактирование текста рукописи; П.Е. Каргополова – выполнение валидационных испытаний; О.М. Стрижакова – разработка методики оценки биологической активности тоцилизумаба, критический пересмотр текста рукописи; И.В. Лягоскин – критический пересмотр текста рукописи, анализ полученных результатов, согласование и утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; А.П. Васильев – разработка методики оценки биологической активности тоцилизумаба; А.С. Першин – критический пересмотр текста рукописи, согласование и утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Additional information. Tables 2–4 are posted on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table2>

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table3>

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-3-317-329-table4>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Yulia A. Nikonova performed validation tests, analysed the results obtained, calculated acceptance criteria, and drafted the manuscript. Svetlana G. Abbasova conceptualised the study, analysed the results obtained, calculated acceptance criteria, drafted and edited the manuscript. Polina E. Kargopolova performed validation tests. Olga M. Strizhakova developed the analytical procedure for assessing the biological activity of tocilizumab and critically revised the manuscript. Ivan V. Lyagoskin critically revised the manuscript, analysed the results obtained, coordinated approvals and approved the final version of the manuscript for publication. Alexandr P. Vasilev developed the analytical procedure for assessing the biological activity of tocilizumab. Andrey S. Pershin critically revised the manuscript, coordinated approvals and approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Никонова Юлия Александровна / Yulia A. Nikonova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-9522-2587>

Аббасова Светлана Георгиевна, д-р биол. наук / Svetlana G. Abbasova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5841-7587>

Каргополова Полина Евгеньевна / Polina E. Kargopolova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4132-5971>

Стрижакова Ольга Михайловна, канд. вет. наук / Olga M. Strizhakova, Cand. Sci. (Vet.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0023-0028>

Лягоскин Иван Владимирович, канд. биол. наук / Ivan V. Lyagoskin, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9058-1106>

Васильев Александр Павлович, канд. биол. наук / Alexandr P. Vasilev, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-1418-6528>

Першин Андрей Сергеевич, канд. вет. наук / Andrey S. Pershin, Cand. Sci. (Vet.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5099-3050>

Поступила 20.12.2023

После доработки 01.04.2024

Принята к публикации 10.04.2024

Received 20 December 2023

Revised 1 April 2024

Accepted 10 April 2024