



Н.А. Алпатова 
О.В. Головинская  
М.Л. Байкова 
С.Л. Лыскова 
Л.А. Гайдерава 

Экспертная оценка определения специфической активности препаратов моноклональных антител биологическим методом *in vitro*

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Головинская Ольга Вячеславовна; golovinskaya@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В целях контроля качества биотехнологических лекарственных препаратов используется ряд биологических методик. Разработка методик определения специфической активности препарата представляет собой сложную процедуру, которая должна отвечать рекомендациям регуляторных нормативных документов, а для адекватного воспроизведения таких методик необходимо их корректное представление в проекте нормативной документации на лекарственный препарат.

ЦЕЛЬ. Обобщение рекомендаций по разработке и описанию в проекте нормативной документации биологических методик *in vitro* для определения активности лекарственных средств на основе моноклональных антител.

ОБСУЖДЕНИЕ. Описаны Fab- и Fc-ассоциированные механизмы проявления биологической активности препаратов моноклональных антител (моно- и биспецифических), рассмотрены *in vivo* и *in vitro* методы изучения указанных механизмов, акцент сделан на анализе репортерного гена. Сформулировано понятие о целостной аналитической системе, необходимой при разработке биологических методик, и проанализированы ее составляющие. Показано, что методика с надежным дизайном позволяет минимизировать влияние критических факторов на результат и снизить риск возникновения случайных и систематических ошибок. Оценена значимость детального отражения критических параметров методики в проекте нормативной документации на лекарственные препараты моноклональных антител.

ВЫВОДЫ. Биологические методики определения активности должны отражать механизм действия лекарственного препарата, а также обладать наименее возможной вариабельностью и наиболее возможной простотой воспроизведения. Адекватность методики и правильно подобранные условия ее применения обеспечивают снижение риска получения недостоверных результатов при контроле качества лекарственного препарата.

Ключевые слова: моноклональные антитела; лекарственные препараты; оценка качества лекарственных препаратов; биологические методики *in vitro*; нормативная документация; биологическая активность; специфическая активность; культуры клеток

Для цитирования: Алпатова Н.А., Головинская О.В., Байкова М.Л., Лыскова С.Л., Гайдерава Л.А. Экспертная оценка определения специфической активности препаратов моноклональных антител биологическим методом *in vitro*. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2025;15(1):44–56. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-44-56>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Natalia A. Alpatova 
Olga V. Golovinskaya 
Marina L. Baykova 
Svetlana L. Lysikova 
Lidia A. Gaiderova 

Expert Assessment of *In Vitro* Potency Assays for Monoclonal Antibody Preparations

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Olga V. Golovinskaya; golovinskaya@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The quality control of biotechnological medicinal products requires a range of biological assay procedures. The development of bioassays for potency determination is a complex process that should comply with the requirements set forth in regulatory standards. For adequate reproducibility, bioassays should be properly described in draft product specification files.

AIM. This study aimed to summarise the recommendations for developing *in vitro* bioassays for potency determination of monoclonal antibody preparations and for describing these bioassays in product specification files.

DISCUSSION. This article describes the Fab- and Fc-associated biological activity mechanisms of monospecific and bispecific monoclonal antibodies. The article covers *in vivo* and *in vitro* methods used to study these mechanisms, with emphasis on the reporter gene assay. The article formulates the concept and analyses the components of a holistic analytical system that is necessary for bioassay development. A well-designed analytical procedure can minimise the influence of critical factors on the test results and reduce the risks of both random and systematic errors. This article presents an estimation of the significance of detailed description of critical procedure parameters in the draft product specification file for a monoclonal antibody.

CONCLUSIONS. A bioassay for the determination of potency should reflect the mechanism of action of the medicinal product and should provide the lowest possible variability and the highest possible ease of use. An adequate analytical procedure with appropriate analytical conditions can reduce the risk of obtaining invalid quality control results.

Keywords: monoclonal antibodies; medicinal products; quality assessment of medicinal products; *in vitro* bioassay; regulatory standards; biological activity; potency; cell cultures

For citation: Alpatova N.A., Golovinskaya O.V., Baykova M.L., Lysikova S.L., Gaiderova L.A. Expert assessment of *in vitro* potency assays for monoclonal antibody preparations. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(1):44–56. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-44-56>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00001-25-00 (R&D Registry No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Моноклональные антитела (МкАТ) — группа лекарственных препаратов, широко представленная как на международном, так и на отечественном фармацевтических рынках [1]. Строгая специфичность к целевым антигенам и избирательное взаимодействие с целевыми рецепторами обеспечивают высокий уровень эффективности МкАТ, что вместе с присущим им разнообразием структуры способствует успешному применению в терапии различных заболеваний.

Лекарственные препараты (ЛП) МкАТ в зависимости от структуры и направленности действия

подразделяются на простые терапевтические, модифицированные МкАТ (биспецифические антитела, Fv-, Fab-, F(ab)₂-фрагменты антител) и конъюгированные, содержащие МкАТ и иное лекарственное средство (ЛС) [2]. Критичные параметры качества (СQA) биотехнологических ЛП — «физические, химические, биологические, микробиологические свойства или характеристики, которые должны находиться в пределах соответствующего диапазона для обеспечения надлежащего качества продукта»¹, устанавливаются и детально изучаются на этапе разработки препарата, оцениваются в процессе

¹ ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development. Scientific guideline.

коммерческого производства с целью выявления его изменчивости, а также контролируются при управлении жизненным циклом после регистрации для гарантии стабильности качества получаемого продукта. Так, критичными для препаратов МкАТ являются молекулярная характеристика (структура, размер, агрегация, гетерогенность и гликозилирование) и функциональная оценка (связывание лиганда, аффинность, активность в тестах с использованием культур клеток, эффекторные функции) [3]. Критичность параметров определяется на основе изучения потенциального влияния на безопасность и эффективность ЛП, при этом влияние на клиническую эффективность оценивается с учетом фармакокинетики и биологической активности [4, 5].

Проявление биологической активности МкАТ обусловлено различными механизмами, среди которых выделяют иммуноопосредованную и прямую клеточную токсичность, влияние на костимулирующие сигналы в процессе развития иммунного ответа, подавление синтеза цитокинов, блокаду рецепторов факторов роста и др. [6]. В отличие от других аналитических методов биологические методы определения активности должны отражать механизм действия каждого конкретного ЛП, следовательно, адекватная оценка функциональных характеристик МкАТ способствует правильному определению их биологической активности [7]. На молекулярном уровне в достижении эффектов препаратов МкАТ ключевую роль играют Fab- и Fc-участки их молекул. Fab-фрагмент отвечает за связывание целевого антигена, а взаимодействие Fc-фрагмента с Fc-рецептором клеток иммунной системы в ответ на образование комплекса Fab-фрагмент-антиген инициирует каскад реакций, завершающихся гибелью клетки-мишени.

По принципу действия препарата методики оценки биологической активности можно разделить на две группы. К первой относятся Fab-ассоциированные методики, принцип которых заключается в оценке связывания МкАТ с клетками, пролиферации клеток, апоптоза, нейтрализации действия и др. Ко второй — Fc-ассоциированные методики, принцип которых обусловлен индукцией эффекторных функций: антитело-зависимая клеточная цитотоксичность, антитело-зависимый клеточный фагоцитоз, анализ связывания с Fc-рецепторами, комплемент-зависимая цитотоксичность и др. [8, 9].

Биологические эффекты МкАТ, детерминированные связыванием, изучают и контролируют такими методами, как поверхностный плазмонный резонанс (surface plasmon resonance, SPR), иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), резонансный перенос энергии флуоресценции, биослойная интерферометрия и анализы связывания лиганда с использованием соответствующих клеточных линий [2, 10, 11]. Для МкАТ, клиническая эффективность которых зависит исключительно от степени связывания (например, проявление их нейтрализующего действия), при достаточном обосновании для оценки активности допускается использовать методики определения связывания с мишенью².

Механизм действия МкАТ может быть обусловлен процессами, происходящими после связывания лиганда. Например, в случае МкАТ, характеризующихся наличием различных мишеней, возможно развитие раннего ответа, опосредованного их влиянием на путь передачи сигнала, или позднего ответа за счет влияния на уровень пролиферации клеток или выработку цитокинов. Поэтому целесообразно определить маркер последующего ответа, который обычно подавляется при использовании МкАТ, и оценивать активность конкретного препарата на основе понимания его механизма действия [3]. Если в проявлении клинической эффективности препарата задействованы эффекторные функции МкАТ, необходимо использовать адекватный биологический метод на основе клеток или иную методику, позволяющую оценить данные функции³.

Таким образом, определения только активности связывания недостаточно для полноценной оценки эффективности ряда препаратов МкАТ, и это может привести к определенной степени риска при оценке их качества.

Перспективным биологическим тестом является анализ репортерного гена для определения экспрессии генов, позволяющий провести функциональную оценку, опосредованную связыванием [12]. Использование репортерных клеточных систем основано на способности функциональных белковых молекул при взаимодействии с рецептором на мембране клетки активировать пути передачи сигналов внутри клеток с участием транскрипционных факторов, в результате чего наблюдается экспрессия репортерного

² Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

³ Там же.

гена, как правило, флуоресцентного белка, которая далее количественно оценивается [13]. Анализ репортерного гена, отражающий механизм действия препарата, являясь более точным, менее вариабельным и трудозатратным, применяется при изучении характеристик, стабильности и доказательстве биоподобия МкАТ, а также для оценки их качества по показателю «Специфическая активность» [14–16].

При изучении биологических свойств и специфической биологической активности терапевтических МкАТ применяют биологические методы *in vivo* и *in vitro* [17]. На этапах разработки использование для оценки активности ЛС методов *in vivo* обосновано, но из-за присущих биологическим методам с использованием животных высокой вариабельности и недостаточной чувствительности при внутрипроизводственном и выпускающем контроле качества, а также в процессе управления жизненным циклом ЛП целесообразно использовать клеточные анализы *in vitro* [3, 18], которые, в свою очередь, позволяют отражать ключевые аспекты механизма действия терапевтического МкАТ [19] и выявлять влияние посттрансляционных модификаций, таких как дезамидирование в области, определяющей комплементарность взаимодействия, или в Fc-области молекулы МкАТ, на проявление активности ЛП [20]. Необходимо учитывать, что определение активности важно при подтверждении стабильности производства МкАТ, и методы ее оценки должны быть достаточно чувствительными для своевременного обнаружения изменений качества препарата МкАТ, которые могут сказаться на его эффективности⁴. При проведении клинических исследований ЛП важно оценить взаимосвязь между проявлением клинического эффекта и специфической биологической активностью, которая оценивается с помощью биологической методики количественного определения.

В Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) и Фармакопее Евразийского экономического союза (ФЕАЭС) к настоящему времени не регламентировано определение специфической активности ЛП на основе МкАТ биологическим методом *in vitro*. Специфическая активность оценивается с использованием оригинальных методик производителей ЛП. При этом должно быть показано, что методика может быть использована для обнаружения

проявления биологической активности и обладает достаточной чувствительностью и специфичностью [21]. В проект нормативной документации ЛП следует включать валидированную биологическую методику, воспроизводимую в условиях аналитической лаборатории.

Цель работы — обобщение рекомендаций по разработке биологических методик *in vitro* для определения активности лекарственных средств на основе моноклональных антител и рекомендаций по описанию указанных методик в нормативной документации.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Рекомендации по разработке биологических методик *in vitro* для определения активности лекарственных средств на основе МкАТ

Общие положения и определения. Биологические методы играют ключевую роль в контроле качества биофармацевтических препаратов, подтверждая постоянство их критических показателей от серии к серии. Разработка методик для оценки активности МкАТ является важным компонентом мониторинга их качества. Целью разработки биологического метода количественного определения является обеспечение оптимальной правильности и прецизионности оценки специфической активности ЛП.

При выборе методик в первую очередь следует определить область их будущего применения: для испытаний при выпуске активной фармацевтической субстанции и ЛП; для оценки стабильности; для аттестации стандартного образца (СО); для изучения характеристик промежуточных продуктов; при оценке сопоставимости продуктов для обоснования изменений, вносимых в процесс производства, и др. Для каждой задачи могут быть установлены разные требования к правильности, специфичности, прецизионности и робастности методики. При этом оптимальным вариантом является разработка и валидация биологической методики оценки активности для многоцелевого применения⁵.

В процессе разработки биологической методики количественного определения активности на основе клеточного анализа большое значение имеет создание целостной аналитической системы, которая позволит достоверно оценивать специфическую активность ЛС. Важную роль играют статистические составляющие,

⁴ [Guidelines for the production and quality control of monoclonal antibodies and related products intended for medicinal use. Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 822, 2022.](#)

⁵ [\(1032\) Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.](#)

такие как тип данных, интенсивность ответа при разных концентрациях, статистическая модель обработки данных, критерии пригодности, анализ выбросов и др. Большинство биологических методик количественного определения предполагает изучение зависимости ответа от концентрации стандартного и испытуемого образцов⁶.

При разработке биологической методики *in vitro* необходимо учитывать следующие определения:

- *независимое испытание* — испытание, в котором все этапы проведения (от забора образца из флакона до получения результата) воспроизводятся для одного планшета, т.е. одному планшету для анализа соответствует один планшет с разведениями, при этом исходные разведения стандартного, контрольного и испытуемого образцов с заданной концентрацией, а также клеточная суспензия с рабочей концентрацией готовятся независимо;
- *независимое разведение* (одна серия) — процесс разведения, который начинается от забора раствора из флакона с исходным образцом и заканчивается получением серии растворов с концентрациями заданного диапазона. Минимальное рекомендованное количество независимых разведений одного образца равно двум;
- *серия разведений* — последовательное снижение концентрации растворов образцов с определенным коэффициентом разведения (шагом) для получения растворов в заданном диапазоне концентраций. Как правило, в методиках оценки активности в серии разведений анализируют от 6 до 10 концентраций. Серии разведений образцов можно получить разными способами, среди которых выделяют: последовательные разведения — каждая из концентраций готовится из предыдущей, а также непоследовательные разведения — приготовление растворов каждой концентрации в серии проводится отдельно из одного исходного флакона с образцом. Следует отметить, что существует промежуточный вариант: одну часть растворов готовят из растворов одной и той же предшествующей концентрации, другую

часть — из растворов другой предшествующей концентрации;

- *повторности* — повторное внесение в лунки планшета образцов одной и той же независимой серии разведений, что способствует снижению появления случайных ошибок (наиболее часто применяется внесение 2–3 повторностей на планшет);
- *отчетное значение* — результат испытания, который представляет собой среднее значение результатов всех независимых испытаний и соответствует установленной для испытуемого образца норме. В подавляющем большинстве случаев количество независимых испытаний равно трем.

Поддержание валидности аналитической системы обеспечивается комплексом составляющих, таких как поверенное оборудование; сертифицированные/квалифицированные реактивы; сертифицированные материалы; аттестованные стандартные и пригодные контрольные образцы; контролируемые условия проведения испытаний; четкое описание аналитических процедур; адекватно подобранная статистическая модель; подходящее программное обеспечение⁷.

Стандартные образцы (СО). Из-за вариабельности, присущей биологическим объектам, специфическая активность в абсолютной системе отсчета — величина менее постоянная, чем относительная активность, которая оценивается путем сравнения зависимости «доза–ответ» препарата и соответствующего СО, активность которого принимается за 1 (или за 100%)⁸. Предполагают, что стандартный и испытуемый образцы биологически подобны, и можно ожидать, что испытуемый образец будет проявлять активность аналогично стандартному образцу.

Биологические методики, применяемые для оценки качества ЛС, должны быть стандартизованы с применением соответствующих международных или фармакопейных стандартных образцов (МСО или ФСО). В течение многих лет после регистрации первых оригинальных ЛП МкАТ такие стандарты отсутствовали, поскольку действующие вещества МкАТ, являясь биотехнологическими продуктами, не имеют природного аналога [22]. В настоящее время утверждено несколько МСО ВОЗ⁹ и стандартов

⁶ ОФС.1.1.0014.15 Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁷ (1034) *Analysis of biological assays*. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

⁸ (1032) *Design and development of biological assays*. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

⁹ *Medicines & Healthcare products Regulatory Agency*.

¹⁰ *Ph. Eur. Reference standards: Orders and catalogue*.

Европейской фармакопеи¹⁰, предназначенных для использования в биологических методиках определения активности ряда препаратов МкАТ.

При отсутствии международных или фармакопейных стандартов для определения активности должен быть разработан СО предприятия, кандидатом которого является серия активной фармацевтической субстанции, охарактеризованная с применением более широкого спектра методов, чем при тестировании в рамках выпуска партий. На поздних этапах разработки СО должен быть изготовлен с применением технологического процесса, который использовался при производстве серий препарата для клинических исследований¹¹.

Для определения количественных характеристик СО необходимо правильное и прецизионное измерение его биологической активности с проведением дополнительных повторных испытаний, поскольку присвоение аттестуемой характеристики стандарту — один из наиболее важных факторов, влияющих на правильность и прецизионность биологического анализа количественного определения специфической активности.

Клеточные линии. Разработка биологической методики количественного определения *in vitro* начинается с выбора или создания клеточной линии. Применяют клеточные линии, полученные из опухолей (например, U-937, линия клеток гистиоцитарной лимфомы человека), фактор-зависимые клеточные линии (например, M-NFS-60, линия клеток миелоидного лейкоза мыши, чувствительная к макрофагальному колониестимулирующему фактору и интерлейкину-3), генетически сконструированные клеточные линии (например, клетки Jurkat-Lucia™ NFAT Cells, полученные из клеточной линии Т-лимфоцитов человека Jurkat посредством стабильной интеграции NFAT-индуцируемого репортерного гена, кодирующего люциферазу Lucia), к которым предъявляются определенные требования. Важным этапом является проверка допустимости использования подходящей линии клеток не только в исследовательских целях, но и при оценке качества ЛП. Следует фиксировать сведения о функциональных и генетических характеристиках линии клеток для биологического метода от ее источника до создания банка клеток. Актуальными являются сведения о морфологии, подлинности, чистоте, условиях криоконсервации, размораживания и культивирования клеток, характеристиках их роста,

функциональной стабильности. Достижения технологии рекомбинантной ДНК и понимание сигнальных механизмов клетки позволили сконструировать линии клеток, позволяющие более точно определять биологическую активность и характеризующиеся постоянным уровнем экспрессии рецепторов, изученной системой передачи сигналов, а также более длительной стабильностью.

Широкий спектр использования клеточных линий при производстве, изучении механизмов действия, эффективности и безопасности биотехнологических ЛП, а также при оценке их качества диктует необходимость проведения аутентификации клеточных линий, а также разработки методов контроля их качества и стандартизации. Следует оценивать специфические параметры, такие как подлинность клеточной линии (генетическое соответствие источнику получения, наличие определенных поверхностных маркеров) и безопасность (отсутствие контаминации вирусами, бактериями, грибами, генетическим материалом других клеточных линий). Аутентификация клеточной линии — это доказательство соответствия исходному материалу на уровне ДНК и отсутствия контаминации другими клеточными линиями [23–25].

Методики с использованием клеточных культур отличаются особой чувствительностью к изменению условий проведения испытания, а также вариабельностью получаемых результатов, поэтому целесообразно учитывать ряд факторов, влияющих на определение активности: тип клеточной культуры (адгезионная или суспензионная), условия размораживания и культивирования, концентрация и конфлюэнтность клеток, состав сред для роста и анализа, условия инкубации, подсчет клеток и оценка их физиологического состояния, номер пассажа клеток, стабильность клеточной линии (уровни экспрессии рецепторов, маркеров)¹².

Выбор условий проведения испытания. Процессы разработки и валидации аналитических методик взаимосвязаны. В каждой методике можно выделить критичные параметры, замена которых приводит к изменению рабочих характеристик методики. Для биологических методик *in vitro* к данным параметрам относятся: клеточная линия, стандартный и контрольный образцы, питательные среды и используемая сыворотка, красители / наборы для детектирования, стабильность образцов/растворов/реагентов, тип

¹¹ (1032) Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

¹² Там же.

и характеристики используемых планшетов, специфическое оборудование, продолжительность инкубации (клеточных культур, образцов и т.д.). Информацию о критичных параметрах следует включать в описание методики. По результатам изучения данных параметров делают вывод об устойчивости (робастности методики) на стадии ее разработки¹³.

При воспроизведении методики существует вероятность появления ошибок, как случайных, так и систематических. Поэтому при разработке условий проведения испытания возможность возникновения ошибок должна быть сведена к минимуму. Поскольку разброс данных является мерой прецизионности, то чем меньше величина случайных ошибок, тем выше прецизионность методики. В появлении случайных ошибок (ошибок при проведении манипуляций) не наблюдается какой-либо закономерности, они происходят при любой постановке и обусловлены субъективными факторами. Способ выявления случайных ошибок — постановка анализа в двух и более повторностях, что приводит к увеличению выборки.

Систематические ошибки имеют определенную причину, повторяются при каждом измерении и влияют на всю серию определений. В качестве причин могут выступать ошибки приборов, неточности в дизайне методики, анализе или описании результатов, а в качестве последствий — возможно искажение результатов испытания. Величина систематической ошибки характеризует правильность результатов, а вероятность обнаружения и предупреждения систематических ошибок не изменяется при увеличении выборки и представляет собой более сложную задачу. Вероятность появления систематических ошибок снижает рандомизация.

Дизайн планшета и рандомизация. Основное условие достоверности многих статистических тестов — рандомизация, то есть случайное распределение серий разведений образцов на планшете, при котором влияние известных и неизвестных факторов (источников систематических ошибок) распределяется равномерно, так, чтобы все объекты во всех лунках планшета в одинаковой степени получили определенное воздействие¹⁴.

Схема распределения серий разведений образцов на планшете должна быть разработана так,

чтобы свести влияние планшета к минимуму [26]. Этого можно достичь, чередуя местонахождение образцов и их разведений на одном или нескольких планшетах. При использовании нескольких планшетов рекомендуется применять дизайн, которым предусмотрено чередование позиций образцов на разных планшетах в рамках одного испытания и для выявления возможной систематической ошибки, вносимой оператором или оборудованием.

Для снижения систематической ошибки между столбцами планшета используют дизайн *strip-plot*, при котором образцы рандомизируются в ряды на планшете, а серии разведений образцов идут в разных направлениях в разных частях планшета. Чередование положений испытуемого и стандартного образцов на нескольких планшетах в рамках одного испытания защищает образцы от влияния их местоположения в ряду планшета. Данный способ рандомизации подходит для внесения образцов на планшет вручную [27].

Альтернативный вариант схемы планшета — *strip-plot*, согласно которому образцы случайным образом распределяются по рядам планшета, а в каждом ряду рандомизируются разведения (концентрации). Однако такую схему внесения образцов сложно применять даже при использовании роботизированной станции¹⁵.

Таким образом, принимая решение о выборе дизайна необходимо не только стремиться снизить риск возникновения систематических ошибок, но и оценить риски возникновения ошибок при проведении манипуляций.

Статистическая модель. Важной составляющей аналитической системы является статистическая модель. Анализировать зависимость «доза–ответ» можно с применением ряда математических моделей, которые позволяют оценить зависимость ответа от концентрации и вычислить относительную специфическую активность.

Модели, отражающие параллельный профиль ответа и позволяющие проводить сравнительную оценку при определении относительной активности, могут быть линейными (модель параллельных прямых) или нелинейными (модель параллельных кривых). Для аппроксимации

¹³ (1033) *Biological assay validation*. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

ICH Q14 *Analytical procedure development*. Scientific guideline.

¹⁴ (1032) *Design and development of biological assays*. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

¹⁵ Там же.

модели параллельного ответа к количественным данным можно использовать несколько функций: линейную, 4-параметрическую (для симметричных S-кривых) и 5-параметрическую (для асимметричных S-кривых)¹⁶. Ключевым предположением при оценке активности является биологическое подобие испытуемого и стандартного образцов. Биологическое подобие предполагает наличие подобия статистического:

- для моделей параллельных прямых и параллельных кривых линии зависимости «доза–ответ» стандартного и испытуемого образцов должны быть параллельны;
- для модели линейного ответа — кривая зависимости «доза–ответ» на протяжении ограниченного диапазона концентраций имеет форму прямой или форму, приближенную к прямой.

Для модели параллельных прямых — в интервале нескольких доз ответ связан линейно с величиной логарифма дозы, и оценку активности проводят путем сравнения линий зависимости ответа от используемых доз испытуемого и стандартного образцов, мера подобия — наклон прямых.

Для нелинейной модели «доза–ответ» диапазон используемых концентраций достаточно широк, ответ ограничен верхними и нижними асимптотами, зависимость ответа от дозы представлена S-образной кривой. В биологических методиках оценки активности для анализа данных наиболее часто используется 4-параметрическая логистическая модель, в которой кривые зависимости «доза–ответ» стандартного и испытуемого образцов характеризуются четырьмя параметрами: верхняя и нижняя асимптоты; угловой коэффициент (β); расстояние между кривыми по оси x (γ). Подобие стандартного и испытуемого образцов может быть оценено по наклону кривых зависимости «доза–ответ» и асимптотам [26]. Кривые зависимости образцов можно сравнивать при одинаковом наклоне и одинаковом уровне верхних и нижних асимптот, кривые должны различаться только по параметру γ , который является показателем активности испытуемого образца¹⁷. Учитывая, что результаты биологической методики обычно нелинейны, определяют и используют в расчетах линейную область кривой зависимости «доза–ответ» в большом диапазоне концентраций.

Критерии пригодности системы. Оценка пригодности аналитической системы — это проверка выполнения основных требований, предъявляемых к ней. От результатов такой проверки зависит достоверность результатов испытания.

К критериям пригодности системы относятся критерии, касающиеся результатов, полученных для стандартного и контрольного образцов. Критерии пригодности 4-параметрической системы:

- требования к стандартной кривой зависимости «доза–ответ»:
 - симметричная форма кривой;
 - на верхней и нижней асимптотах, а также линейной части кривой должно находиться не менее 3 точек;
 - коэффициент детерминации R^2 (т.е. степень линейной взаимосвязи между двумя наборами данных) должен составлять, например, $\geq 0,980$;
 - отношение максимального сигнала стандартного образца к минимальному сигналу должно быть, например, ≥ 7 ;
- требование к первичным данным:
 - значения коэффициентов вариации (CV, %) первичных данных (значения оптической плотности, единиц флуоресценции и т.п.) для каждого разведения СО должны находиться в определенном диапазоне (например, не более 15–25%).

Если полученные результаты не отвечают одному или более критериям пригодности, то необходимо проведение повторного испытания. Только при выполнении всех критериев пригодности системы можно оценивать результаты анализа испытуемого образца.

Критерии приемлемости результатов испытания. Приемлемость результатов испытания оценивают для подтверждения, что данные, полученные для испытуемого образца, удовлетворяют предположению о его сходстве со стандартным образцом. Для 4-параметрической модели, например, применимы следующие критерии приемлемости результатов испытания.

- Требования к кривой зависимости «доза–ответ» испытуемого образца:
 - кривые испытуемого и стандартного образцов должны быть признаны эквивалентными (параллельными) по результатам теста на эквивалентность;

¹⁶ (1032) *Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.*

ОФС.1.1.0014.15 Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

¹⁷ (1034) *Analysis of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.*

- коэффициент детерминации R^2 должен составлять не менее 0,95;
 - отношение углового коэффициента β должно быть, например, в диапазоне от 0,80 до 1,25;
 - соотношение значений верхних асимптот кривых испытуемого и стандартного образцов¹⁸ должно быть, например, в диапазоне от 0,80 до 1,25;
 - соотношение значений нижних асимптот кривых испытуемого и стандартного образцов¹⁹ должно быть, например, в диапазоне от 0,80 до 1,25.
- Требование к первичным данным:
 - значения CV для каждого разведения испытуемого образца должны находиться в определенном диапазоне (например, не более 15–25%).

Если хотя бы один из критериев не выполняется, расчет отчетного значения не производят. Если для результатов, полученных для испытуемого образца, выполняются критерии приемлемости и сходства со стандартным образцом, рассчитывают относительную активность, которая определяется как отношение значений полумаксимальных разведений или концентраций для стандартного и испытуемого образцов.

Одного независимого испытания бывает недостаточно для получения отчетного значения, включаемого в протокол испытания, поэтому для определения активности объединяют результаты нескольких независимых испытаний и рассчитывают среднее. Затем рассчитывают дисперсию и меру неопределенности оценки относительной активности.

- Требование к результатам испытаний:
 - коэффициент вариации значений активности испытуемого образца, полученных в результате валидированного количества независимых испытаний, должен составлять, например, не более 15–25%.

Если результат не удовлетворяет требованиям, испытание повторяют.

Особенности оценки активности биспецифических МкАТ. Биспецифические антитела (BsAbs) (относятся к иммуноглобулинам класса G (IgG)) фактически аналогичны по структуре моноспецифическим. Отличие состоит в том, что Fab-фрагменты биспецифического антитела различны, что позволяет ему связывать либо две

разные мишени, либо два разных эпитопа одной и той же мишени [12, 28, 29]. Также разработаны IgG-подобные (dual variable domain Ig, DVD-Ig) и отличающиеся от IgG (bispecific T-cell engager, BiTE) биспецифические антитела, взаимодействующие с Т-клетками [30].

К общим механизмам действия BsAbs относится прямое связывание с растворимыми мишенями (лигандами, цитокинами) или рецепторами на поверхности клеток с подавляющим или стимулирующим эффектом [31]. Из-за специфичности одного ЛП к разным мишеням биологические методики для оценки активности BsAbs должны предусматривать возможность отразить несколько механизмов действия препарата, а также выявить его потенциальные синергические эффекты и структурные изменения [31, 32].

Для препаратов BsAbs допустим поэтапный подход к внедрению биологического метода определения активности. На ранних этапах разработки возможно применение методик оценки связывания (ELISA или SPR). На более поздних этапах, перед клиническими исследованиями, целесообразна разработка биологических методик *in vitro*. При этом дизайн биологических тестов определяется предполагаемым физиологическим механизмом действия BsAbs, в зависимости от которого применяют одну или две методики оценки активности. Для определения активности при выпуске препарата и тестировании стабильности целесообразно разработать комбинированную методику анализа, позволяющую реализовать оба механизма действия биспецифического антитела в одном тесте, однако такой подход применим не к каждому препарату BsAbs [32].

Таким образом, биологические методики отражают аспекты активности МкАТ, включая связывание лиганда с рецептором, процессы передачи сигнала и конечные наблюдаемые биологические эффекты. Результаты оценки биологической активности имеют решающее значение на всех этапах разработки биотехнологических продуктов, от ранних этапов до контроля качества готовой продукции.

Рекомендации по изложению методики в проекте нормативной документации

В соответствии с положениями «Руководства по составлению нормативного документа (НД) по качеству лекарственного препарата»²⁰

¹⁸ Может быть оценено не соотношение асимптот, а отклонение асимптот, выраженное в %.

¹⁹ То же.

²⁰ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07.09.2018 № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

«Нормативный документ по качеству на основании проведенной экспертизы лекарственного препарата устанавливает требования к контролю качества лекарственного препарата и содержит спецификацию и описание методик испытаний или ссылки на соответствующие фармакопейные статьи ФЕАЭС. Если метод и (или) методика испытания не описаны в ФЕАЭС, приводится полное описание применяемых метода и (или) методики». Проект нормативной документации должен содержать подробное описание методики определения активности с включением необходимой информации для ее воспроизведения и объективного анализа полученных данных.

В ГФ РФ и ФЕАЭС не регламентирована процедура определения специфической активности МкАТ, поэтому с целью унификации изложения раздела «Специфическая активность» в проектах НД на ЛП данной группы авторы, руководствуясь нормативно-правовыми актами в сфере обращения лекарственных средств на территории РФ²¹, общими фармакопейными статьями ГФ РФ²², положениями зарубежных фармакопей²³ и руководством²⁴, а также многолетним экспертным опытом [33], обобщили рекомендации к содержанию указанного раздела (табл. 1)²⁵. Название показателя и в спецификации, и в тексте проекта должно быть идентично принятому в ОФС.1.7.1.0014.18 «Моноклональные антитела для медицинского применения» ГФ РФ XIV изд. В случае когда

Таблица 1. Содержание раздела «Специфическая активность» проекта нормативной документации на моноклональные антитела для медицинского применения

Table 1. Content of the Potency section of a draft product specification file for a monoclonal antibody for human use²⁵

Подраздел	Содержание подраздела
Норма	Верхняя и нижняя границы нормы с указанием единиц измерения (как указано в Спецификации)
Метод	Название метода (как указано в Спецификации), в скобках может быть указан способ оценки активности (например, биологический метод <i>in vitro</i> (определение комплемент-зависимой цитотоксичности))
Принцип метода	Лаконично изложенный механизм действия лекарственного препарата, отражающий суть методики
Оборудование	Полный пронумерованный перечень оборудования: названия производителей и моделей, указание на возможность использования аналогичного
Материалы	Полный пронумерованный перечень материалов: названия производителей, действительные каталожные номера, указание на возможность использования аналогичных, если допустимо, или на недопустимость замены, если материалы критичные
Реактивы	Полный пронумерованный перечень реактивов: названия производителей, действительные каталожные номера, указание на возможность использования аналогичных, если допустимо, или на недопустимость замены, если реактивы критичные
Стандартные/контрольные (если применимо) образцы	Полное название, активность или концентрация (с указанием единиц измерения аттестованной характеристики), производитель (для международных и фармакопейных стандартных образцов — код и каталожный номер соответственно), условия и срок хранения образца до и после использования; для внутреннего стандартного образца фирмы — откалиброван ли он относительно международного или фармакопейного; для контрольного образца — является ли он самостоятельным образцом или в качестве внутреннего контрольного образца используют независимое разведение стандарта
Клеточные линии	Полные названия клеточных линий, коллекций культур клеток, каталожные номера (или указание на рабочий банк клеток фирмы-производителя) и условия хранения; данные о клеточных линиях, не требующих рутинного культивирования, готовых к приготовлению рабочей суспензии сразу после оттаивания (ready-to-use или ready-to-plate)
Программное обеспечение	Полный перечень программ (с номером версии) для статистической обработки результатов анализа

²¹ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07.09.2018 № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

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

²² ОФС.1.1.0014.15 Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

²³ (1032) Design and development of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024.

(1034) Analysis of biological assays. United States Pharmacopeia. Rockville; 2024

2928 Infliximab concentrated solution. European Pharmacopoeia.

²⁴ ICH Topic Q6B Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products.

ICH Q14 Analytical procedure development. Scientific guideline.

²⁵ Перевод таблицы 1 размещен на сайте журнала (English translation of Table 1 is available at the website of the journal). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-44-56-table1>

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Подраздел	Содержание подраздела
Приготовление культуральных сред и рабочих растворов реактивов	Подробное последовательное описание процедур приготовления питательных сред, растворов реактивов и реагентов, указание масс навесок, объемов растворителей, конечных концентраций или процентного содержания всех компонентов, входящих в состав раствора, условия приготовления (нагревание, перемешивание, фильтрование, асептические условия и т.п.), условия применения (нагревание, охлаждение, защита от света и т.п.), условия хранения (температура, допустимость и длительность хранения до и после использования в испытании и т.п.). В названии отражают назначение раствора/среды
Работа с культурой клеток	Подробное описание этапов работы с клеточной культурой: 1. Инициация клеточной культуры — условия и продолжительность оттаивания, манипуляции с культурой после восстановления: нейтрализация среды для замораживания, центрифугирование, подсчет, посев в культуральные флаконы, условия последующей инкубации, допустимый предел жизнеспособности клеток при размораживании. 2. Рутинное культивирование (для клеток «ready-to-use» пункт пропускается) — процедура пере-сева, концентрация клеточной суспензии в зависимости от периодичности пассажей и площади флакона, допустимый предел жизнеспособности клеток, допустимый предел конфлюэнтности, процедура подсчета клеток, формулы определения плотности и жизнеспособности клеток с под-формульными расшифровками, условия инкубации, количество пассажей с момента инициации до использования культуры в испытании, номер пассажа, после которого культуру не используют. 3. Подготовка клеточной суспензии для использования в испытании — процедура доведения клеточной суспензии до рабочей концентрации, объем, достаточный для одного планшета
Приготовление разведений стандартного/контрольного/испытуемого образцов	Подробное и последовательное описание пробоподготовки: предварительные манипуляции с образцами (размораживание, восстановление, выдерживание при комнатной температуре), продолжительность и условия хранения после размораживания/восстановления, приготовление исходных разведений образцов с указанием растворителя и концентрации образца, пошаговая инструкция приготовления серийных разведений в формате таблицы (кратность разведений, ис-ходная и конечная концентрации на каждом этапе, объемы образца и растворителя для каждой концентрации), схема планшета для приготовления разведений с расшифровкой (если примени-мо), указание на количество повторностей одной серии разведений каждого образца, которые предполагается вносить на аналитический планшет
Процедура проведения испытания	Подробное и последовательное описание этапов заполнения аналитического планшета в том порядке, который предусмотрен методикой: объем и концентрация клеточной суспензии, объемы и концентрации образцов, вносимых в лунки планшета, объемы и концентрации других реаген-тов, используемых в испытании, продолжительность и условия инкубации планшета на каждом этапе заполнения, схема аналитического планшета с расшифровкой; пояснение, что представ-ляет собой одно независимое испытание (например, результат, полученный на одном планшете для анализа, для которого независимо были приготовлены: клеточная суспензия, серия разведе-ний каждого образца, другие реагенты), а также количество независимых испытаний, достаточ-ных для получения отчетного значения (например, 3)
Учет результатов	Порядок и условия регистрации результатов (встряхивание планшетов перед считыванием, длины волн, количество вспышек на лунку, точка считывания (дно/поверхность), направление считывания (по рядам/по столбцам) и другие параметры настроек прибора, которые не являются установленными по умолчанию
Анализ данных	Статистическая модель для анализа результатов считывания, параметры статистической аналити-ческой программы, которые необходимо задать для получения отчетного значения, формулы расчетов с подформульными расшифровками и единицами измерения, рисунок типичной кривой зависимости «доза–ответ», указание, что каждый планшет анализируется независимо
Критерии пригодности системы	Перечень критериев соответствия результатов, полученных для стандартного образца (сим-метричность кривой зависимости «доза–ответ», амплитуда отклика, значения коэффициентов корреляции и вариации первичных данных для повторностей каждой концентрации и т.д.)
Критерии приемлемости результатов испытания	Перечень критериев, доказывающих подобие испытуемого (контрольного) и стандартного образ-цов (соотношение значений угловых коэффициентов, верхних асимптот, нижних асимптот кривых испытуемого (контрольного) и стандартного образцов; значения коэффициентов вариации перв-ичных данных для повторностей каждой концентрации испытуемого (контрольного) образца)
Отчетное значение активности	Формула для вычисления значения относительной специфической активности одного независи-мого определения, формула расчета отчетного значения специфической активности испытуемо-го образца на основании значений активности, полученных в результате установленного коли-чества независимых испытаний, которые удовлетворяют всем критериям пригодности системы и приемлемости результатов), подформульные обозначения, допустимое значение коэффициента вариации значений независимых определений активности
Несоответствие результатов	Порядок действий при получении неудовлетворительных результатов (при оценке критериев пригодности системы или приемлемости результатов, при расчете отчетного значения, включаемого в протокол испытания)

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

«Подлинность»/«Идентификация» препаратов МкАТ оцениваются по их способности проявлять специфическую активность, формулировка названия метода должна в точности соответствовать формулировке, приведенной для показателя «Специфическая активность» с указанием на одновременное определение этих показателей, а нормативные требования устанавливаются как «должен проявлять специфическую активность в заданном диапазоне».

Следует отметить, что приведенный в *таблице 1* пример содержания раздела «Специфическая активность» нормативной документации также применим к большинству биотехнологических препаратов, специфическая активность которых определяется биологическим методом на культуре клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биологические методики *in vitro*, применяемые для количественного определения активности

препаратов МкАТ разной специфичности, отличаются принципом действия и имеют свои особенности. Для воспроизведения конкретной методики необходима соответствующая чувствительная культура клеток, определенный набор питательных сред, реагентов и материалов, для учета результатов – подходящее высокочувствительное оборудование. В связи с этим изложение методик оценки качества препарата должно соответствовать требованиям²⁶ к оформлению нормативного документа, быть подробным, последовательным и понятным. Корректное оформление нормативной документации обеспечивает точное воспроизведение методик испытаний, выполнение лабораторной фармацевтической экспертизы образцов лекарственных средств в контрольных аналитических лабораториях на должном уровне, получение адекватных результатов экспертизы и правильную их трактовку и снижает риск поступления в медицинскую практику недоброкачественных лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Халимова АА, Орлов АС, Таубэ АА. Анализ локализации производства биотехнологических лекарственных препаратов в России с учетом происхождения активных фармацевтических субстанций. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(1):53–61. Khalimova AA, Orlov AS, Taube AA. Analysis of biopharmaceutical manufacturing localisation in Russia considering the country of origin of active pharmaceutical ingredients. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(1):53–61 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-1-53-61>
2. Gogesch P, Dudek S, van Zandbergen G, Waibler Z, Anzaghe M. The role of Fc receptors on the effectiveness of therapeutic monoclonal antibodies. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8947. <https://doi.org/10.3390/ijms22168947>
3. Wang X, An Z, Luo W, Xia N, Zhao Q. Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. *Protein Cell*. 2018;9(1):74–85. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0447-x>
4. Alt N, Zhang TY, Motchnik P, Taticek R, Quarby V, Schlothauer T, et al. Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. *Biologicals*. 2016;44(5):291–305. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2016.06.005>
5. Gao X, Wang W, Tesar D, Wei B, Eschelbach J, Kelley RF, Jiang G. An approach to bioactivity assessment for critical quality attribute identification based on antibody-antigen complex structure. *J Pharm Sci*. 2021;110(4):1652–60. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.12.027>
6. Joshi S, Rathore AS, Krull IS. Analytical characterization of biotherapeutic products, Part II: The analytical toolbox. *LCGC North Am*. 2018;36(11):814–22.
7. Rathore AS, Dash R. Tools for functional assessment of biotherapeutics. *LCGC North Am*. 2021;39(6):272–77.
8. Cedeño-Arias M, Sánchez-Ramírez J, Blanco-Santana R, Rengifo-Calzado E. Validation of a flow cytometry based binding assay for evaluation of monoclonal antibody recognizing EGF receptor. *Sci Pharm*. 2011;79(3):569–81. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1104-18>
9. Kamen L, Myneni S, Langsdorf C, Kho E, Ordonia B, Thakurta T, et al. A novel method for determining antibody-dependent cellular phagocytosis. *J Immunol Methods*. 2019;468:55–60. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.03.001>
10. Dash R, Singh SK, Chirmule N, Rathore AS. Assessment of functional characterization and comparability of biotherapeutics: a review. *AAPS J*. 2021;24(1):15. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00671-0>
11. Heinrich L, Tissot N, Hartmann DJ, Cohen R. Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity. *J Immunol Methods*. 2010;352(1–2):13–22. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.10.002>
12. Register AC, Tarighat SS, Lee HY. Bioassay development for bispecific antibodies-challenges and opportunities. *Int J Mol Sci*. 2021;22(10):5350. <https://doi.org/10.3390/ijms22105350>
13. Wang L, Yu C, Wang J. Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuticals. *Biotechnol Adv*. 2020;39:107466. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107466>
14. Chen W, Pandey M, Sun H, Rolong A, Cao M, Liu D, et al. Development of a mechanism of action-reflective, dual target cell-based reporter bioassay for a bispecific monoclonal antibody targeting human CTLA-4 and PD-1. *MAbs*. 2021;13(1):1914359. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1914359>
15. Lallemand C, Liang F, Staub F, Simansour M, Vallette B, Huang L, et al. A novel system for the quantification of the ADCC activity of therapeutic antibodies. *J Immunol Res*. 2017;2017:1–19. <https://doi.org/10.1155/2017/3908289>
16. Wang L, Yu C, Yang Y, Gao K, Wang J. Development of a robust reporter gene assay to measure the bioactivity of anti-PD-1/anti-PD-L1 therapeutic antibodies. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;145:447–53. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.011>
17. Alhazmi HA, Albratty M. Analytical techniques for the characterization and quantification of monoclonal antibodies. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(2):291. <https://doi.org/10.3390/ph16020291>
18. Bansal R, Dash R, Rathore AS. Impact of mAb aggregation on its biological activity: Rituximab as a case study. *J Pharm Sci*. 2020;109(9):2684–98. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.05.015>
19. Tada M, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Kawasaki N. Development of a cell-based assay measuring the activation of FcγRIIIa for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *PLoS One*. 2014;9(4):e95787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095787>
20. Geigert J. Quality attributes of a biopharmaceutical. In:

²⁶ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 07.09.2018 № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

- Geigert J. *The challenge of CMC regulatory compliance for biopharmaceuticals*. Switzerland: Springer; 2019. P. 311–29.
21. Алпатова НА, Гайдерова ЛА, Яковлев АК, Мотузова ЕВ, Лысикова СЛ, Солдатов АА, Авдеева ЖИ. Особенности определения специфической активности биотехнологических лекарственных средств. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(1):13–26. Alpatova NA, Gaiderova LA, Yakovlev AK, Motuzova EV, Lysikova SL, Soldatov AA, Avdeeva Zhl. Peculiarities of determination of specific activity of biotechnological medicinal products. *BiOpreparations. Prevention, diagnostics, treatment*. 2017;17(1):13–26 (In Russ.). EDN: YHSSGL
 22. Prior S, Hufton SE, Fox B, Dougall T, Rigsby P, Bristow A. International standards for monoclonal antibodies to support pre- and post-marketing product consistency: Evaluation of a candidate international standard for the bioactivities of rituximab. *MAbs*. 2018;10(1):129–42. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1386824>
 23. Rižner TL, Adamski J. It is high time to discontinue use of misidentified and contaminated cells: Guidelines for description and authentication of cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;182:1–3. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.12.017>
 24. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Меркулов ВА, Олефир ЮВ, Ручко СВ, Бокованов ВЕ. Идентификация клеточных линий человека с использованием метода генотипирования короткими tandemными повторами: мировая практика. *Биофармацевтический журнал*. 2015;7(6):3–10. Melnikova EV, Merkulova OV, Merkulov VA, Olefir YuV, Ruchko SV, Bokovanov VE. Human cell line identification by typing of short tandem repeats: World practice. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2015;7(6):3–10 (In Russ.). EDN: VRRBXF
 25. Хорольский МД, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Применение метода коротких tandemных повторов для аутентификации клеточных линий. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(4):251–60. Khorolsky MD, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. The use of short tandem repeat analysis for cell line authentication. *BiOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(4):251–60 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-4-251-260>
 26. White JR, Abodeely M, Ahmed S, Debaue G, Johnson E, Meyer DM, 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>
 27. Zimmermann H, Gerhard D, Dingermann T, Hothorn LA. Statistical aspects of design and validation of microtitre-plate-based linear and non-linear parallel *in vitro* bioassays. *Biotechnol J*. 2010;5(1):62–74. <https://doi.org/10.1002/biot.200900146>
 28. Surowka M, Klein C. A pivotal decade for bispecific antibodies? *MAbs*. 2024;16(1):2321635. <https://doi.org/10.1080/19420862.2024.2321635>
 29. Nie S, Wang Z, Moscoso-Castro M, D'Souza P, Lei C, Xu J, Gu J. Biology drives the discovery of bispecific antibodies as innovative therapeutics. *Antib Ther*. 2020;3(1):18–62. <https://doi.org/10.1093/abt/tbaa003>
 30. Mohan N, Ayinde S, Peng H, Dutta S, Shen Y, Falkowski VM. Structural and functional characterization of IgG- and non-IgG-based T-cell-engaging bispecific antibodies. *Front Immunol*. 2024;15:1376096. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1376096>
 31. Lee HY, Contreras E, Register AC, Wu Q, Abadie K, Garcia K, et al. Development of a bioassay to detect T-cell-activating impurities for T-cell-dependent bispecific antibodies. *Sci Rep*. 2019;9(1):3900. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40689-1>
 32. Lee HY, Schaefer G, Lesaca I, Lee CV, Wong PY, Jiang G. “Two-in-One” approach for bioassay selection for dual specificity antibodies. *J Immunol Methods*. 2017;448:74–9. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.05.011>
 33. Головинская ОВ, Лысикова СЛ, Лебедева ЮН, Алпатова НА, Мовсесянц АА, Меркулов ВА. Рекомендации по изложению методики оценки биологической (специфической) активности биотехнологических лекарственных препаратов в нормативной документации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(3):168–74. Golovinskaya OV, Lysikova SL, Lebedeva YuN, Alpatova NA, Movsesyants AA, Merkulov VA. Recommendations for the presentation of the methodology for assessing the biological (specific) activity of biotechnological drugs in regulatory documentation. *BiOpreparations. Prevention, diagnostics, treatment*. 2018;18(3):168–74 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-168-174>

Дополнительная информация. Перевод таблицы 1 размещен на сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств».

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-44-56-table1>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Н.А. Алпатова — идея исследования, написание текста рукописи, обобщение материалов исследования; О.В. Головинская — концепция и дизайн исследования, формулировка выводов; М.Л. Байкова — обобщение материалов исследования, интерпретация результатов; С.Л. Лысикова — сбор данных литературы; Л.А. Гайдерова — утверждение окончательной версии рукописи для опубликования.

Additional information. Table 1 in English is published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-1-44-56-table1>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Natalia A. Alpatova conceived the study idea, drafted the manuscript, and summarised the study material. Olga V. Golovinskaya conceptualised and designed the study; formulated the conclusions. Marina L. Baykova summarised the study material and interpreted the results. Svetlana L. Lysikova collected literature data. Lidia A. Gaiderova approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Алпатова Наталья Александровна, д-р биол. наук / Natalia A. Alpatova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6807-508X>

Головинская Ольга Вячеславовна, канд. мед. наук / Olga V. Golovinskaya, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6966-9859>

Байкова Марина Леонидовна / Marina L. Baykova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9889-4038>

Лысикова Светлана Леонидовна, канд. мед. наук / Svetlana L. Lysikova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7864-8972>

Гайдерова Лидия Александровна, канд. мед. наук / Lidia A. Gaiderova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6176-5934>

Поступила 25.11.2024

После доработки 15.01.2025

Принята к публикации 11.02.2025

Received 25 November 2024

Revised 15 January 2025

Accepted 11 February 2025