



О.А. Ваганова 
Р.С. Смирнов 
С.А. Ленин 
К.С. Фунташев 
А.А. Костромских 
А.С. Перегудова 
Д.А. Кадыкова 
В.А. Меркулов 

Моноклональные антитела: разработка платформенных методик оценки примесей высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений

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

✉ Ваганова Ольга Александровна; vaganova@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Разработка унифицированных методик контроля качества лекарственных средств на основе моноклональных антител (МАТ) является одной из задач стандартизации МАТ.

ЦЕЛЬ. Разработка и анализ возможности применения платформенных (универсальных) методик для оценки содержания примесей высокомолекулярных соединений и фрагментов, негликозилированных молекул в различных МАТ методами эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Лекарственные препараты, содержащие МАТ, 28 различных международных непатентованных наименований российского и иностранного производства. Исследования методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭХ) проводили на приборах Agilent Technologies серии 1200, оснащенных детекторами поглощения в УФ-области. Обработку и анализ хроматограмм осуществляли с помощью программного обеспечения OpenLab. Капиллярный гель-электрофорез (КГЭ) проводили в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с использованием системы PA 800 plus (Beckman Coulter), оснащенной диодно-матричным детектором с поглощением в УФ-области и программным обеспечением Beckman 32Karat.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Подобраны универсальные условия пробоподготовки, хроматографического и электрофоретического разделения и определения содержания целевых соединений в препаратах МАТ, методики апробированы на 28 МАТ. Для каждого МАТ определены времена удерживания и времена миграции пиков целевых соединений. Проведено сравнение данных, полученных по разработанным методикам и по оригинальным методикам производителей МАТ. Проведена валидация методик определения содержания в образцах МАТ высокомолекулярных соединений методом ЭХ, фрагментов МАТ и негликозилированных молекул тяжелых цепей МАТ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях методом КГЭ. Правильность, воспроизводимость и чувствительность методик соответствуют установленным требованиям. Полученные результаты оценки валидационных характеристик методики ЭХ: прецизионность (*RSD*) площадей пиков составила для мономера не более 0,4%, для групп агрегатов до 8%, для общей площади пиков не более 0,4%, для относительной площади пика, соответствующего мономеру, — 0,02%. Линейность методики подтверждена в диапазоне концентраций 0,5–120%, правильность — в линейном диапазоне 99,1–102,1%, предел количественного определения (ПКО) — 0,1%. Валидационные характеристики методики КГЭ: прецизионность не более 1% для содержания основного пика иммуноглобулина или суммы пиков тяжелых и легких цепей и не более 1% для абсолютных времен миграции основных пиков. Линейность методик подтверждена в диапазоне концентраций от ПКО до 300%. Правильность для обеих методик составила 97,6–103,7%, ПКО — 0,5 и 0,75% соответственно.

ВЫВОДЫ. Разработанные методики оценки чистоты препаратов МАТ являются универсальными для неконъюгированных МАТ; по валидационным характеристикам специфичности, прецизионности, предела количественного определения, аналитической области, линейности, правильности соответствуют установленным критериям приемлемости и могут применяться на любом этапе жизненного цикла препаратов указанной группы.

Ключевые слова: моноклональное антитело; капиллярный электрофорез; эксклюзионная хроматография; качество лекарственных средств; нормативный документ; высокоэффективная жидкостная хроматография; платформенная методика; универсальная методика; валидация; чистота

Для цитирования: Ваганова О.А., Смирнов Р.С., Ленин С.А., Фунташев К.С., Костромских А.А., Перегудова А.С., Кадыкова Д.А., Меркулов В.А. Моноклональные антитела: разработка платформенных методик оценки примесей высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):330–346. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР № 124022200093-9).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Olga A. Vaganova ✉ 
Roman S. Smirnov 
Sergei A. Lenin 
Kirill S. Funtashev 
Anastasia A. Kostromskih 
Alexandra S. Peregudova 
Darya A. Kadykova 
Vadim A. Merkulov 

Monoclonal Antibodies: Development of Universal (Platform) Methods for the Assessment of High and Low-molecular Weight Impurities

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

✉ Olga A. Vaganova; vaganova@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The development of unified techniques for quality control monoclonal antibodies (mAb) is one of the challenges for mAbs quality standardization.

AIM. This study aimed to develop and analyse the possibility of using platform (universal) techniques for estimating the impurity content of high molecular weight compounds and fragments, non-glycosylated molecules in various mAbs by methods of size-exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) and capillary electrophoresis methods.

MATERIALS AND METHODS. MABs-containing medicinal products from 28 different international nonproprietary names of Russian and foreign origin. Studies by SE-HPLC were carried out on Agilent Technologies 1200 series instruments equipped with UV detectors, with data processed via OpenLab software. Capillary gel electrophoresis (CGE) was conducted under both reducing and non-reducing conditions using a PA 800 plus system (Beckman Coulter) with UV diode array detection, and Beckman 32Karat software.

RESULTS. Universal sample preparation protocols and separation conditions were established and validated across 28 mAbs. Retention times and relative migration times of target compounds peaks were determined for each mAb. Comparative analysis demonstrated concordance between platform methods and manufacturers' proprietary methods. Validation of methods for determination of the content of high-molecular weight compounds in mAbs samples by the SE-HPLC method, fragments of mAbs and non-glycosylated variants of heavy chains of mAbs under reducing and non-reducing conditions by the CGE method was performed. The accuracy, precision, and sensitivity of the methods met the established requirements. The validation characteristics obtained for the SE-HPLC method were as follows: precision (*RSD*) of peak areas was no more than 0.4% for the monomer, up to 8% for aggregate groups, no more than 0.4% for total peak areas, and 0.02% for the relative peak area corresponding to the monomer. The method's linearity was confirmed within the concentration range of 0.5–120%, accuracy within 99.1–102.1%, and the limit of

quantification (LOQ) was 0.1%. For the CGE method, the validation characteristics showed precision of no more than 1% for intact immunoglobulin content or heavy and light chain peaks, and no more than 1% for absolute migration times of main peaks. Linearity was confirmed from LOQ to 300% concentration range. The accuracy for both methods ranged from 97.6–103.7%, with LOQ values of 0.5% and 0.75%, respectively.

CONCLUSIONS. The developed methods for assessing the purity are universal for unconjugated mAbs products. Their validation characteristics — including specificity, precision, limit of quantification, analytical range, linearity, and accuracy — meet all established acceptance criteria. These methods can be reliably implemented at any stage of the product lifecycle for this category of medicinal products.

Keywords: monoclonal antibody; mAb; capillary electrophoresis; size exclusion chromatography; quality of medicines; normative document; high performance liquid chromatography; platform technique; universal technique

For citation: Vaganova O.A., Smirnov R.S., Lenin S.A., Funtashev K.S., Kostromskih A.A., Peregodova A.S., Kadykova D.A., Merkulov V.A. Monoclonal antibodies: Development of universal (platform) methods for the assessment of high and low-molecular weight impurities. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):330–346. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346>

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. 124022200093-9).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Рынок биотехнологических препаратов в целом и моноклональных антител (МАТ) в частности бурно развивается [1]. С первыми лекарственными препаратами данной группы, зарегистрированными на рынках США и ЕС в конце 90-х гг. XX века, в настоящее время конкурируют препараты из европейских стран, Республики Корея, Китая, Индии, Ирана [2]. Наряду с регулярным появлением новых, оригинальных МАТ постоянно увеличивается доля биоаналогичных лекарственных препаратов.

В части контроля качества препаратов и разработки методик испытаний данной группы лекарственных средств (ЛС) также имеются приоритеты развития. Один из них — унификация применяемых методик испытаний и переход производителей на использование платформенных подходов (универсальных методик испытаний), применяемых для лекарственных средств различных составов, содержащих МАТ различных международных непатентованных наименований (МНН), производимых одной компанией как на одной, так и на разных производственных площадках.

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (ЭХ) — основной метод мониторинга высокомолекулярных соединений (ВМС), таких как димеры и олигомеры, используемый как на стадии разработки, так и для рутинного

контроля качества МАТ. Оценка содержания родственных и производственных примесей (в том числе нежелательных молекулярных вариантов) основывается на разнице их гидродинамических радиусов. Преимущество метода: минимальное влияние на конформацию белка и его структуру, возможность разделения компонентов с различной молекулярной массой (ММ) (например, мономер с ММ ~150 кДа и ВМС с ММ ≥ 300 кДа).

В качестве подвижных фаз в ЭХ применяют натриевые или калиевые фосфатные буферы, в качестве неподвижной фазы колонок — гидрофильный силикагель, оптимальный размер пор хроматографической колонки составляет 200–300 Å, что позволяет определять примеси размером до 500 кДа [3]. Детектирование проводится чаще при длине волны 280 нм, иногда при 214 нм¹ [4]. Перспективным направлением совершенствования данных методик является переход к методам ультраэффективной ВЭЖХ и подбор хроматографических колонок, неподвижная фаза которых не проявляет неспецифическую сорбцию определяемых соединений² [4].

Метод капиллярного гель-электрофореза (КГЭ) широко используется для анализа чистоты нативных белков (мономеров) (в невозстанавливающих условиях, НВУ) и определения суммарного содержания легких и тяжелых цепей (в восстанавливающих условиях, ВУ), низкомолекулярных

¹ Koza SM., Yang H., Yu YQ. Expanding size-exclusion chromatography platform method versatility for monoclonal antibody analysis using Waters XBridge Premier Protein SEC Columns. *Waters*. 2023;720007500.

² Там же.

примесей (фрагментов), а также неполностью сформировавшихся МАТ — негликозилированных молекул, тяжелых и легких цепей антител и их комбинаций³ [5]. В качестве фонового электролита используется гель, содержащий додецилсульфат натрия (ДСН). Коммерческие гелевые матрицы, имеющие также в своем составе линейные или слабо разветвленные полимеры (линейный полиакриламид, полиэтиленоксид, полиэтиленгликоль, декстран и пуллулан), позволяют разделять белковые молекулы в диапазоне ММ 10–225 кДа. Использование готовых коммерческих гелей в качестве разделяющего буфера позволяет резко повысить воспроизводимость и правильность получаемых результатов [6, 7].

Пробоподготовка анализируемых образцов при использовании метода КГЭ включает стадию нагревания в присутствии ДСН в высокой концентрации, что приводит к денатурации вторичных и третичных структур белка, в результате чего молекулы белка становятся равномерно заряженными. Метод определения основан на разделении, идентификации и определении содержания образующихся в результате денатурации комплексов «ДСН–белок» в кварцевом капилляре под действием приложенного высокого напряжения. Возникающее при этом у комплексов «ДСН–белок» постоянное отношение заряда к массе позволяет проводить их разделение по молекулярной массе, что обусловлено различием скорости миграции комплексов через матрицу геля, выступающей в качестве молекулярного сита, за счет различия их гидродинамических радиусов.

В НВУ денатурацию анализируемых белков проводят в присутствии алкилирующих реагентов (йодацетамид, N-этилmaleимид), блокирующих свободные сульфгидрильные группы; в ВУ — в присутствии 2-меркаптоэтанола или дитиотреитола, восстанавливающих дисульфидные связи белка до гликозилированной и негликозилированной тяжелых цепей и легкой цепи. Анализ МАТ в ВУ позволяет оценить степень гликозилирования тяжелых цепей и применяется для оценки количественного содержания негликозилированной тяжелой цепи. Для целей оценки деградации/стабильности продукта

более информативным является определение в НВУ, поскольку в этом случае удается оценить собственную фрагментацию образца (в ВУ часть фрагментов может образоваться в ходе реакции восстановления МАТ и разрыва цепей) [8]. Оценка чистоты МАТ методом КГЭ охватывает все перечисленные группы примесей и проводится в условиях как ВУ, так и НВУ [9].

Как правило, в КГЭ используется детектирование в УФ-области спектра, а также флуориметрическое детектирование. Методики с флуориметрическим детектированием имеют значимое (100-кратное) преимущество по чувствительности определения по сравнению с УФ-детектированием, но при этом требуют более сложной пробоподготовки, предусматривающей использование дорогостоящих реактивов. Для рутинных методик определения чистоты и гетерогенности более предпочтительным является УФ-детектирование. КГЭ с флуориметрическим детектированием может быть применен не только для определения чистоты белка, но и, поскольку является более чувствительным, в качестве дополнительного метода обнаружения примесей клеток-хозяев — для обнаружения минорных количеств посторонних белковых частиц [10].

Создание унифицированных методик для МАТ является задачей, решаемой по всему миру. Так, в США в настоящее время действует монография Фармакопеи США (USP)⁴, содержащая платформенную методику определения примесей высокомолекулярных соединений (ВМС) в МАТ методом высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. В качестве подвижной фазы используется буферный раствор, содержащий хлорид и фосфат калия с pH 6,2. В монографиях Европейской фармакопеи (Ph. Eur.) на голимумаб⁵ и инфликсимаб⁶, а также в проектах на готовую лекарственную форму голимумаба⁷, активную фармацевтическую субстанцию (АФС)⁸ и ЛП⁹ устекинумаба в качестве подвижных фаз указаны буферные растворы, содержащие фосфат натрия в различных концентрациях без/с добавкой натрия хлорида. Для анализа всех упомянутых МАТ используется одна и та же неподвижная фаза

³ Felten C., Solano O.S. Capillary electrophoresis in quality control: Part I: Application for therapeutic proteins. *SCI/EX*. 2018.

⁴ <129> Analytical procedures for recombinant therapeutic monoclonal antibodies. <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/biologics/guide-proc-for-recombinant-therapeutic.pdf>

⁵ 01/2025:3103 Golimumab concentrated solution. European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2025.

⁶ 04/2023:2928 Infliximab concentrated solution European Pharmacopoeia 11th ed. Strasbourg: EDQM; 2023.

⁷ PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 17 ANP. XXXX:3187 Golimumab injection. Ph. Eur. 36.3; 2024.

⁸ PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 17 ANP. XXXX:3165 Ustekinumab concentrated solution. Ph. Eur. 36.3; 2024.

⁹ PA/PH/Exp. P4Bio/T (21) 17 ANP. XXXX:3188 Ustekinumab injection. Ph. Eur. 36.3; 2024.

(хроматографические колонки (размер зерна 5 мкм, 7,8×300 мм) с гидрофильным силикагелем в качестве сорбента). Для анализа лекарственной формы голимумаба (по сравнению с АФС голимумаба) в дополнение к хроматографической колонке используется предколонка 5 мкм, 0,4×6 мм. Скорости потоков составляют 0,5 мл/мин (USP¹⁰) и 1,0 мл/мин (все монографии Ph. Eur.). Детектирование осуществляется либо при одной длине волны — 280 нм, либо одновременно на двух длинах волн — 214 и 280 нм.

Задача работы — разработка и валидация методик, предназначенных для испытания ЛС, содержащих МАТ, по показателю «Чистота». Новизна предлагаемого решения авторов заключается в оптимизации условий определения, позволяющих оценивать чистоту любых МАТ двумя ортогональными методами. Испытание по универсальным (платформенным) методикам было проведено для максимально широкого перечня МАТ различных МНН, произведенных как отечественными, так и зарубежными производителями, для 28 МАТ по методике ЭХ ВЭЖХ и 18 МАТ по методике КГЭ.

Цель работы — разработка и анализ возможности применения универсальных (платформенных) методик для оценки содержания примесей высокомолекулярных соединений, фрагментов, негликозилированных молекул в различных моноклональных антителах методами эксклюзионной хроматографии и капиллярного электрофореза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В качестве исследуемых образцов использовали лекарственные препараты отечественного и зарубежного производства, соответствующие следующим МНН: пембролизумаб, бевацизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, ниволумаб, вендолизумаб, секукинумаб, ранибизумаб, экулизумаб, даратумумаб, пертузумаб, динутуксимаб бета, устекинумаб, цетуксимаб, дупилумаб, олокизумаб, нетакимаб, равулизумаб, сарилумаб, элутузумаб, леканемаб, безлтоксумаб, инфликсимаб, полатузумаб ведотин, атезолизумаб, иксекизумаб, рисанкизумаб, сенипрутут.

Для приготовления подвижных фаз при проведении хроматографических исследований использовали: гидрофосфат калия (кат. № 029619, Central Drug House Ltd.); дигидрофосфат калия (кат. № 60220, Sigma-Aldrich); хлорид калия (кат.

№ 1.04933.0500, Merck). Для коррекции pH применяли концентрированную фосфорную кислоту (кат. № 345245, Sigma-Aldrich). Для проведения электрофореза использовали SDS-гель буферный раствор и SDS-MW буферный раствор для образцов (кат. № 390953, AB Sciex), йодацетамид (кат. № RC-150, G-Biosciences), β-меркаптоэтанол (кат. № 1425ML100, neoFroxx), 0,1 М натрия гидроксид (кат. № 390953, AB Sciex); 0,1 М хлористоводородную кислоту (№ 390953, AB Sciex). Применяли следующие стандартные образцы (СО): внутренний СО — 10 кДа, 5 мг/мл (кат. № 390953, AB Sciex); СО для гель-фильтрации: тиреоглобулин, бычий гамма-глобулин, куриный овальбумин, лошадиный миоглобин и витамин В₁₂ (кат. № 1511901, Bio-Rad); рабочие СО анализируемых МАТ (in-house СО).

Хроматографические колонки: TSKgel G3000swxl, 5 мкм, 7,8×300 мм (PN:0008541, SN: 0156A068346, LN: 015GA, Tosoh); Phenomenex BioSep SEC-s3000, 5 мкм, 7,8×300 мм (PN:00H-2146-KO, SN: H21-322431, LN: 6583-0331, Phenomenex).

Все подвижные фазы и растворы готовили с использованием воды высокоочищенной, полученной на установке Milli-Q Integral 15 (Millipore® Corp.), с последующей фильтрацией под вакуумом через одноразовые системы с мембранным фильтром из полиэфирсульфона с диаметром пор не более 0,2 мкм (кат. № EXVF1000YPS02CZS, GVS).

Оборудование. Использовали хроматографы Agilent Technologies серии 1200, оснащенные детекторами поглощения в УФ-области: диодно-матричными детекторами и детекторами с фиксированной длиной волны (VWD). Для обработки и анализа полученных хроматограмм применяли программное обеспечение OpenLab¹¹. Использовали систему капиллярного электрофореза PA 800 plus (Beckman Coulter), оснащенную диодно-матричным детектором с поглощением в УФ-области, при использовании апертуры 100×200 мкм (кат. № 144712, Beckman Coulter). Полученные электрофореграммы обрабатывали с помощью программного обеспечения Beckman 32Karat¹².

Пробоподготовка. Эксклюзионная хроматография. Образцы анализировали, используя хроматографические колонки для гель-фильтрации, обеспечивающие диапазон определения целевых

¹⁰ <129> Analytical procedures for recombinant therapeutic monoclonal antibodies. <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/biologics/guide-proc-for-recombinant-therapeutic.pdf>

¹¹ <https://www.agilent.com/en/product/software-informatics/analytical-software-suite/chromatography-data-systems/openlab-cds>

¹² <https://sciex.com>

молекулярных масс, характерных для димеров и агрегатов МАТ в диапазоне 10–500 кДа. Исследуемые образцы готовили восстановлением до концентраций 10 мг/мл с использованием подвижной фазы. СО, содержащий маркеры молекулярных масс, восстанавливали и далее разводили водой для хроматографии до концентрации 10 мг/мл.

Капиллярный гель-электрофорез в невосстанавливающих условиях. Исследуемые образцы разбавляли SDS-MW буферным раствором до расчетной концентрации целевого белка 1 мг/мл. К 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего СО 10 кДа, затем образцы обрабатывали 5 мкл раствора 250 мМ йодоацетамиды и нагревали в течение 3 мин при 70 °С. Охлаждали образцы в течение 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 300g в течение 1 мин.

Капиллярный гель-электрофорез в восстанавливающих условиях. Исследуемые образцы разбавляли SDS-MW буферным раствором до расчетной концентрации целевого белка 1 мг/мл. К 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего СО 10 кДа. Далее осуществляли восстановление дисульфидных связей образцов добавлением 5 мкл раствора β-меркаптоэтанола и нагреванием в течение 3 мин при 100 °С с последующим охлаждением и центрифугированием при 300g в течение 1 мин.

Валидацию методик проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ), Фармакопеи Евразийского экономического союза (ФЕАЭС)¹³ [11] по следующим критериям: специфичность, прецизионность, линейность, правильность, пределы определения и количественного определения, диапазона применимости и устойчивости (робастности) разработанных методик.

Статистическая обработка результатов. Проводили оценку площадей (или скорректированных площадей в случае метода КГЭ) целевых пиков, времени удерживания целевых пиков (хроматографические методы) и времени миграции (метод КГЭ), рассчитывали среднее арифметическое и относительное стандартное отклонение (RSD, %). Интервал значений относительных

величин представлял собой величину среднего арифметического значения с учетом отклонений на трехкратную величину стандартного отклонения (SD). Способы расчета и выбор представления значения характеристики и неопределенности соответствовал требованиям ГОСТ Р 8.694-2010¹⁴. Общие статистические принципы определения метрологических характеристик соответствовали требованиям ГФ РФ и Решения Коллегии ЕЭК¹⁵.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основное внимание при разработке методик уделялось их универсальности, то есть возможности определять целевые соединения в любых МАТ, относящихся к разным МНН и имеющим различное специфическое действие. Проводилась работа по допустимому «упрощению» методик в части применения коммерчески доступных и, по возможности, недорогих реактивов, материалов и СО. При этом «упрощение» не должно было приводить к потере специфичности методик и снижению таких аналитических характеристик, как правильность, чувствительность, специфичность.

На первом этапе оценивалась специфичность методики, на втором этапе была проведена количественная оценка по наиболее важным валидационным параметрам: специфичности, воспроизводимости и правильности. Полученный хроматографический профиль и данные по содержанию целевых компонентов (мономер и примесей ВМС), определенные по разработанной нами методике, сравнивали с результатами, полученными при анализе МАТ каждой из исследованных серий с использованием оригинальных методик (ретроспективные данные ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, полученные в результате уставной деятельности учреждения). В случае получения удовлетворительных результатов методики испытаний направлялись отечественным производителям МАТ на апробацию. При этом в ходе апробации в лабораториях отечественных производителей МАТ и при валидации методик авторами подтверждена их специфичность, воспроизводимость и правильность, гарантирующие соответствие методик заявленным целям, для всех испытанных МАТ.

¹³ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023. ОФС 2.3.14.0 Валидация аналитических методик. Фармакопея Евразийского экономического союза Т. 1. Ч. 2. М.; 2023.

¹⁴ ГОСТ Р 8.694-2010 (Руководство ИСО 35:2006) Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы материалов (веществ). М.; 2012.

¹⁵ ОФС 1.1.0013 Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

Решение Коллегии ЕЭК от 04.10.2022 № 137 «О внесении изменений в Руководство по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

После учета замечаний, полученных от производителей МАТ, проводилась валидация методик.

При разработке методик основывались на принципах, изложенных в ГФ РФ¹⁶ и в Решениях Коллегии ЕЭК¹⁷.

Платформенная методика определения содержания высокомолекулярных родственных примесей с использованием метода эксклюзионной хроматографии. При разработке методики определения примесей ВМС в качестве подвижной фазы использовали фосфатно-солевой буферный раствор с pH 6,2, содержащий 200 мМ фосфата калия, 250 мМ хлорида калия. В качестве аналитической была выбрана длина волны 280 нм, которая, имея несколько меньший (по сравнению с детектированием на длине волны 214 нм) отклик, тем не менее обладает большей специфичностью для определяемых соединений, обусловленной отсутствием вклада поглощения полисорбата, который практически всегда входит в состав рецептурного буфера АФС и ЛП терапевтических МАТ. Детектирование проводили в двух вариантах: на диодноматричном детекторе (DAD) и на более чувствительном детекторе с фиксированной длиной волны (VWD). Испытания на детекторе VWD проводились для оценки необходимости повышения чувствительности методики. В качестве неподвижной фазы апробированы 2 варианта хроматографических колонок: колонка TSKgel и колонка BioSep (табл. 1).

По итогам экспериментов была подтверждена специфичность колонки TSKgel по отношению к проанализированным МАТ. Также отмечено,

что на колонке TSKgel разделение целевых соединений происходит только по эксклюзионному механизму, то есть порядок выхода и относительные времена удерживания (RRT) всех элюируемых соединений (пиков) не меняются независимо от МАТ. Стандартное время удерживания мономера МАТ, имеющего молекулярную массу ~150 кДа, в выбранных условиях испытания составило 15–18 мин, высокомолекулярные примеси элюировались с относительным временем удерживания (RRT) 0,80–0,85 по отношению к пику мономера (рис. 1. Хроматограмма пемролизумаба. Опубликовано на сайте журнала (Приложение 1)¹⁸).

При испытании на колонке BioSep были выявлены неспецифические сорбционные взаимодействия анализируемых белков и сорбента: порядок элюирования пиков менялся, RRT имел нехарактерные значения. Так, например, мономер пембролизумаба и его высокомолекулярные примеси дополнительно удерживаются по обращенно-фазовому механизму, что следует из изменения времени удерживания и изменения порядка выхода пиков. Время удерживания мономера составляет от 24,5 до 25,5 мин, пики примесей ВМС имеют измененный порядок выхода (пик агрегата 1 и агрегата 2 меняются местами) (рис. 2. Хроматограмма пемролизумаба. Опубликовано на сайте журнала (Приложение 1)¹⁹). При использовании колонки BioSep подвижную фазу потребовалось бы корректировать введением какого-либо органического модификатора, в связи с этим от дальнейшего использования колонки BioSep при разработке платформенной методики отказались.

Таблица 1. Технические характеристики хроматографических колонок

Table 1. Comparative analysis of the technical parameters of TSKgel columns

Параметры	Характеристики	
	Tosoh 0008541 TSKgel® G3000SWXL	Phenomenex BioSep-SEC-s3000
Скорость потока / предельное давление	0,5–1,0 мл/мин (≤ 72 бар)	≤1500 psi (~100 бар)
Рабочий диапазон pH	2,5–7,5	2,5–7,5
Максимальная температура	10–30 °C	50 °C
Диапазон эксклюзии (глобулярные белки)	до 500000 Да	5000–700000 Да
Размер пор	25 нм	29 нм

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

¹⁶ ОФС.1.2.1.2.0001 Хроматография; ОФС.1.2.1.0022.15 Капиллярный электрофорез; ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

¹⁷ Решения Коллегии ЕЭК от 07.09.2018 № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата»; от 04.10.2022 № 137 «О внесении изменений в Руководство по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

¹⁸ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>

¹⁹ Там же.

Хроматографические профили, а также содержания компонентов препаратов, определенные с использованием колонки TSKgel по платформенной методике и оригинальным методикам, используемым для контроля качества препаратов, сопоставимы (табл. 2; рис. 3. Хроматограмма олокизумаба. Сопоставление профилей МАВ, полученных по платформенной и оригинальной методикам; рис. 4. Хроматограмма даратумаба. Сопоставление профилей МАТ, полученных по платформенной и оригинальной методикам, Опубликовано на сайте журнала (Приложение 1)²⁰). В оригинальных методиках используются колонки TSKgel BioAssist G3SW_{XL} биоинертная версия G3000SWXL, а также колонка, аналогичная предложенной в платформах, TSKgel G3000SWXL 300×7,8, 5 мм, которые позволяют корректно разделять высокомолекулярные соединения и мономер.

Чистота объектов, определенная двумя способами, коррелирует (принимая во внимание то, что в исследовании использованы образцы с уже истекшим сроком годности, что обусловило увеличение примесей ВМС на момент испытаний по разрабатываемой методике) (табл. 2). В таблицу не включены данные по содержанию низкомолекулярных примесей (НМС),

поскольку данную методику не рекомендуется использовать для оценки этой группы примесей без дополнительной верификации или валидации для конкретного объекта испытаний. Содержание примесей ВМС и мономера рассчитывали методом внутренней нормализации площадей в процентах от общей площади всех пиков белковой природы на хроматограмме (включая пики НМС). Интегрирование пика мономера выполняли по наиболее строгому варианту с разметкой не полностью разделенных пиков и «плечевых» пиков примесей НМС путем опускания перпендикуляра к общей базовой линии. Таким образом, при расчетах учитывался вклад примесей НМС в общую площадь интегрируемых пиков. Правильность определения НМС как таковых недостаточна, но в силу их относительно малого содержания (в сравнении с мономером и общей площадью пиков) погрешность оценки содержания мономера при таком подходе минимальна.

Стандартные образцы. В качестве СО использовали два типа образцов: СО, содержащий маркеры молекулярной массы, и СО предприятия, аттестованный в установленном порядке, содержащий анализируемый МАТ. Оба типа СО использовались только для проверки пригодности

Таблица 2. Оценка содержания мономера и высокомолекулярных соединений (оцененные методом внутренней нормализации) в моноклональных антителах (МАТ)

Table 2. Results of a comparative assessment of the content of monomer and high-molecular compounds (estimated by the internal normalization method), in% for some of the studied MABs

Международное непатентованное наименование МАТ	Срок годности испытуемых МАТ	Результаты, полученные по платформенной методике		Результаты, полученные по оригинальной методике	
		Мономер, %	ВМС, %	Мономер, %	ВМС, %
Ниволумаб	2021 г.	99,1	0,8	99,0	0,7
Экулизумаб № 1	2021 г.	98,8	1,0	99,5	0,5
Экулизумаб № 2	2021 г.	99,4	0,4	99,5	0,3
Олокизумаб	2021 г.	98,9	1,0	99,2	0,8
Даратумаб	2021 г.	98,0	1,6	98,4	1,4
Пембролизумаб	2023 г.	98,9	1,1	99,8	0,2
Данатуксимаб	2023 г.	99,6	0,3	99,7	0,1
Устекинумаб	2020 г.	98,5	0,3	99,1	0,7
Цетуксимаб	2018 г.	99,2	0,3	99,4	0,3
Тоцилизумаб	2023 г.	99,4	0,5	99,5	0,4
Дупилумаб	2020 г.	97,2	2,0	98,5	1,5
Пертузумаб+Трастузумаб	2021 г.	98,7	0,5	99,6	0,3

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ВМС — высокомолекулярные соединения, МАТ — моноклональные антитела для медицинского применения.

²⁰ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>

хроматографической системы. В качестве СО с маркерами молекулярной массы использовали набор, содержащий 5 маркеров ВМС (тиреоглобулин, бычий гамма-глобулин, куриный овальбумин, лошадиный миоглобин (белки с ММ 17000–670000 Да) и НМС витамин В₁₂ (ММ 1350 Да)). Может быть использован иной набор аналогичных по качеству СО (маркеров) молекулярной массы, состав которого может быть сокращен, но должен включать один маркер НМС, элюирующегося с общим свободным объемом колонки, и как минимум два белка-маркера с молекулярными массами 50000–600000 Да, отличающимися друг от друга не менее чем в 2 и не более чем в 4 раза.

Оценка пригодности хроматографической системы. Оценка пригодности хроматографической колонки проводили по хроматограмме СО смеси белков-маркеров и НМС; оценку разделительной способности хроматографической системы — с использованием СО маркеров молекулярных масс и СО испытуемого МАТ, обогащенного примесями ВМС. Обогащенный примесями ВМС образец получали путем принудительной деградации СО МАТ в условиях: 1) УФ-облучение при длине волны 254 нм в течение 1 ч с размещением источника облучения на расстоянии 10 см от образца; 2) воздействие повышенной температуры 105 °С в течение 4 ч; 3) воздействие повышенной температуры 60 °С в течение 30 мин. После проведения принудительной деградации количество примесей ВМС возрастало до 5, 15 и 1,7% соответственно.

Оценка пригодности хроматографической системы включала в себя проверку по критериям, требуемым ГФ РФ²¹.

Описание методики и условия проведения анализа. Описание приготовления растворов испытуемых и стандартных образцов, подвижной фазы, требования к пригодности хроматографической системы разработанной универсальной методики определения содержания высокомолекулярных примесей с использованием метода эксклюзионной ВЭЖХ представлены в Приложении 2 (опубликовано на сайте журнала²²). Раствор сравнения 1 включает маркеры молекулярных масс, раствор сравнения 2 включает стандартный образец анализируемого МАТ (in house).

Условия хроматографирования: колонка — 300×7,8 мм, гидрофильный силикагель для хро-

матографии (5 мкм), размер пор 25 нм, пригодный для разделения глобулярных белков в диапазоне молекулярных масс 10000–500000 Да (например, TSKgel G3000SWXL, 300×7,8 мм, 5 мкм, размер пор 25 нм, Tosoh Bioscience, кат. № 0008541); температура колонки — 23±2 °С; скорость потока — 0,5 мл/мин; детектор — УФ-детектор при 280 нм; температура автосэмплера — 2–8 °С; объем пробы — 20 мкл; нагрузка белка на колонку около 200 мкг; время хроматографирования — 30 мин.

Последовательность хроматографирования. Хроматографировали растворы в следующей последовательности, вводя пробы в количествах, кратных «n»: контрольный раствор (n=1), раствор плацебо (n=1), раствор сравнения 2 (n=2), раствор для оценки чувствительности хроматографической системы (n=1), раствор сравнения 1 (n=3), испытуемый раствор (n=2), раствор сравнения 1 (n=1). Оценка пригодности хроматографической колонки для целей методики и оценку эффективности колонки выполняли с использованием раствора СО маркеров. Оценка разделительной способности и воспроизводимости используемой хроматографической системы — с использованием раствора сравнения СО МАТ.

Обработка результатов и анализ данных. Определение содержания целевых соединений осуществлялось методом внутренней нормализации площадей. На хроматограммах испытуемого раствора и раствора СО МАТ идентифицировали пик мономера как пик самой большой площади, с временем удерживания меньшим, чем время удерживания пика низкомолекулярного маркера молекулярной массы на хроматограмме раствора сравнения 2 и пиков компонентов плацебо. Пики с меньшими временами удерживания, чем пик мономера, соответствовали пикам высокомолекулярных соединений, с большими — пикам низкомолекулярных соединений.

Интегрирование пиков соединений с временем удерживания меньшим, чем время удерживания низкомолекулярного маркера молекулярной массы на хроматограмме раствора сравнения 2, проводили в соответствии с ГФ РФ²³. В расчетах не учитывали пики, присутствующие на хроматограмме контрольного раствора, раствора плацебо, а также отдельно стоящие пики с площадью менее площади пика мономера

²¹ ОФС.1.2.1.2.0001 Хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

²² <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex2>

²³ ОФС.1.2.1.2.0005 Высокоэффективная жидкостная хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.

на хроматограмме раствора для оценки чувствительности хроматографической системы.

Пики ВМС и НМС, имеющие общую базовую линию и отделенные друг от друга вертикальными линиями разметки, учитывали независимо от их содержания.

Валидацию методики определения содержания высокомолекулярных примесей методом эксклюзионной хроматографии проводили на препарате, содержащем пембролизумаб. В соответствии с требованиями ГФ РФ и ФЕАЭС²⁴ проводилась оценка специфичности, прецизионности, линейности, правильности, предела определения и предела количественного определения, диапазона применимости и устойчивости (робастности) разработанной методики.

Оценку *специфичности* проводили путем визуального сравнения хроматограмм испытуемых образцов и хроматографического профиля, получаемого для каждого из исследуемых МАТ по оригинальной методике производителей данных МАТ. Также для подтверждения отсутствия влияния вспомогательных веществ на профиль хроматограммы использовали растворы плацебо. В качестве раствора плацебо использовали рецептурный буферный раствор, содержащий все компоненты готового нерасфасованного продукта, активной фармацевтической субстанции или ЛП (кроме самого МАТ) и разведенный аналогично испытуемому раствору. Все получаемые хроматографические профили соответствовали профилям, полученным по оригинальным методикам. На хроматограммах растворов плацебо не было обнаружено аналитически значимых пиков в диапазонах времен удерживания пиков целевых соединений. Таким образом, специфичность методики была подтверждена.

Прецизионность. Оценка повторяемости проводилась путем расчета значения *RSD* относительных значений площадей целевых пиков, а также их времен удерживания. Статистическую обработку проводили по результатам измерения шести независимых проб одной серии препарата с индивидуальной пробоподготовкой в разные дни двумя аналитиками в одних условиях хроматографирования. Значение показателя *RSD* абсолютных площадей пиков при оценке сходимости работы аналитиков составило: для мономера — 0,37%, для группы агрегатов № 1 — 8%, группы агрегатов № 2 — 0,51%, для общей площади пиков, принимаемых в расчет, — 0,39%. Для относительной площади мономера *RSD*

составило 0,02%. Значение *RSD* абсолютных времен удерживания пиков составило: для мономера — 0,03%, для группы агрегатов № 1 — 1,73%, группы агрегатов № 2 — 0,06 %.

Прецизионность методики также оценивали по аналогичным критериям для СО белков-маркеров молекулярных масс.

Значение показателя *RSD* абсолютных площадей пиков при оценке сходимости работы аналитиков составило: для тиреоглобулина — 1,39%, гамма-глобулина — 4,24%, овальбумина — 7,1%, миоглобина — 0,84%, витамина В₁₂ — 1,10%, общей площади пиков — 2,04%. Для относительной площади пика витамина В₁₂ *RSD* составило 2,27%, для абсолютных времен удерживания пиков указанных соединений — 0,01–0,05%.

Линейность. Линейность методики определяли путем оценки коэффициента детерминации (*r*²) линейной регрессии зависимости отклика детектора (по пику мономера) от концентрации испытуемого раствора в диапазоне 0,5–20%. Для этого последовательно анализировали в одних хроматографических условиях растворы с концентрацией специфичного МАТ (мг/мл (%)): 0,005 (0,5); 0,01 (1); 0,025 (2,5); 0,05 (5); 0,075 (7,5); 0,25 (25); 0,5 (50); 0,8 (80); 1,0 (100); 1,2 (120). Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной модели. Отдельно оценивали диапазоны 0,5–7,5% (для оценки неспецифической сорбции белка в системе) и 80–120%. Значение *r*² площади пика мономера на участках как нижней, так и верхней границ диапазона составило 1,0000. Таким образом, линейность методики была подтверждена в диапазоне концентраций 0,5–120% от целевой концентрации испытуемых растворов, значительного влияния неспецифической сорбции белка в нижней части аналитического диапазона методики не выявлено.

Правильность методики оценивали с помощью данных, полученных при подтверждении линейности методики. Для этого вычисляли открываемость относительно теоретического значения для рассчитанной по уравнению линейной регрессии концентрации каждого проанализированного раствора. Значение открываемости составило: в диапазоне 0,5–7,5% — от 99,9 до 102,1%; в диапазоне 80–120% — от 99,05 до 99,22%. Таким образом, правильность методики была подтверждена.

Предел количественного определения методики был установлен на уровне 0,5% от целевой

²⁴ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. Т. 1. М.; 2023.
ОФС 2.3.14.0 Валидация аналитических методик. Фармакопея Евразийского экономического союза Т. 1. Ч. 2. М.; 2023.

концентрации белка, в соответствии с данными, полученными при подтверждении линейности и правильности методики.

Платформенная методика определения родственных примесей (фрагментов) методом капиллярного электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. При разработке методики КЭФ основывались на данных литературы [8, 12], а также на протоколе пробоподготовки руководства «Система фармацевтического анализа PA 800 plus SDS-MW метод разделения белков по размеру Beckman Coulter», США²⁵.

Пробоподготовка. Исследуемые образцы разбавляли SDS-MW буферным раствором для образцов до расчетной концентрации целевого белка 1 мг/мл, после чего к 95 мкл полученного раствора добавляли 2 мкл внутреннего СО 10 кДа. Далее в НВУ добавляли 5 мкл раствора для алкилирования и нагревали в течение 3 мин при 70 °С. В ВУ осуществляли восстановление дисульфидных связей МАТ путем добавления 5 мкл раствора β-меркаптоэтанола, после чего нагревали образцы в течение 3 мин при более высокой температуре (100 °С). По окончании нагревания все образцы охлаждали при комнатной температуре и центрифугировали при 300g.

Оригинальные методики также основаны на протоколах, сопровождающих аналитическое оборудование, но варьируются в части соотношений целевого белка и реактивов (растворы йодацетамида, 2-меркаптоэтанола), используемых в пробоподготовке, различного состава и значений pH буферных растворов, целевых концентраций белка (колеблются в интервале 1,0–2,5 мг/мл). Значительные отличия имеются в условиях проведения этапа термической обработки реакционной смеси. Применяются капилляры различной длины (общей и эффективной) от 50 до 67 см и от 10 до 20 см соответственно, разделение в диапазоне напряжений от 0 до +30 кВ (повышение напряжения от 0 кВ до 15,0 кВ за 1,0 мин), с величиной тока от 0 до 300 мкА, условий подготовки капилляра к разделению (промывка и кондиционирование) ввода и разделения образцов на приборе (настройки оборудования), времени электрофоретического разделения. Все вышеперечисленное оказывает прямое влияние на чувствительность и разделительную способность системы. Различным является подход к расчету и оценке результатов испытаний.

В изначально выбранных условиях испытания (величина тока менее 10 кВ и время разделения

30 мин) для нескольких МАТ в НВУ на электрофореграммах наблюдалась неполная картина разделения, часть пиков ВМС оказалась за пределами рабочего времени проведения электрофореза (более 30 мин) и они не отразились на электрофореграммах, что было неприемлемым. Для оптимизации разделения в ВУ и НВУ были подобраны следующие условия электрофоретического разделения.

Капилляр: кварцевый капилляр без покрытия Uncoated Capillary, внутренний диаметр 50 мкм, общая длина 30,2 см, эффективная длина 20 см (из набора SDS-MW Analysis Kit, кат. 338451, Beckman Coulter), апертура 100×200 мкм (кат. № 144712, Beckman Coulter).

Условия разделения: ввод пробы — электрокинетический, в течение 20 с при 5 кВ, полярность — обратная (ввод с длинного конца капилляра); параметры разделения — напряжение 15,0 кВ, давление 20 psi на оба конца капилляра, линейное повышение напряжения от 0 до 15,0 кВ за 1,0 мин, время разделения 40 мин. **Детектирование:** детектор — УФ-детектор, аналитическая длина волны — 220 нм, частота сбора данных — 2 Гц, ширина щели 10 нм. Температура капилляра — 25±2 °С. Температура автосэмплера — 25±2 °С. Смена растворов (цикл) — каждые 8 вводов.

Время разделения может изменяться в зависимости от анализируемого объекта, но должно составлять не менее 1,1 от времен миграции пика тяжелой цепи на электрофореграмме восстановленного раствора сравнения или 1,1 от времен миграции основного пика на электрофореграмме невосстановленного раствора сравнения.

Стандартные образцы. Использовали два типа стандартных образцов: внутренний СО и СО, содержащий определяемый МАТ. Внутренним СО, предназначенным для количественного определения целевых пиков, являлся маркер молекулярной массы — иммуноглобулин с ММ 10 кДа. Второй стандартный образец — СО предприятия (in-house), аттестованные в установленном порядке, содержащие МАТ, испытания которых проводились методом КГЭ. Для проверки пригодности электрофоретической системы использовался in-house СО МАТ.

Провести сравнительный анализ результатов, полученных по разным методикам, для всех исследованных в этой работе МАТ не представлялось возможным, поскольку для анализа некоторых из них в оригинальных методиках

²⁵ PA 800 plus Pharmaceutical analysis system. User manuals. Application guide. SDS-MW Analysis.

использован метод электрофореза в полиакриламидном геле, для некоторых метод интегрирования пиков и способ расчета содержания отличается от принятого в платформенной методике, для некоторых оценка фрагментов вообще не была предусмотрена на этапе выходного контроля МАТ и не была включена в нормативную документацию.

Немаловажным фактором при сравнении результатов, полученных методом КГЭ с использованием оригинальной и платформенной методик, является способ интегрирования пиков и способ расчета чистоты в МАТ. Оригинальные методики по-разному оценивают чистоту МАТ (содержание фрагментов): в одних случаях к основным пикам относят только пик интактного иммуноглобулина (НВУ) или пики легкой и тяжелой цепей (ВУ) (методики определения МАТ № 2–3). В других случаях с основными пиками суммируют пик негликозилированной тяжелой цепи, повышая таким образом относительную площадь на 2–5% (методики определения МАТ № 1), что приводит к завышению результатов (табл. 3).

Оценка пригодности электрофоретической системы. Проверку пригодности системы осуществляли с использованием СО испытуемого МАТ. Основными критериями пригодности системы являлись:

- выявление примесей в соответствии с заявленным пределом обнаружения методики и количественную оценку в соответствии

с заявленным пределом количественного определения (оценка чувствительности по значению отношения сигнал/шум);

- разделение примесей между собой и с пиками мономера/легкой/тяжелой цепей (требование к степени разрешения между пиками и числу теоретических тарелок);
- миграция пиков всех оцениваемых соединений от зоны ввода пробы к детектору (требование к времени миграции пика внутреннего СО (10 кДа));
- параметры пиков соединений позволяют оценивать их с приемлемой воспроизводимостью и правильностью (требования к относительному стандартному отклонению скорректированной площади пиков и времени их миграции, требование к значению симметрии пиков).

Описание методики и условия проведения анализа. Детальное описание приготовления растворов испытуемых и стандартных образцов в условиях НВУ и ВУ, программы предварительного кондиционирования капилляра, разделения, промывки капилляра после проведения анализа, требования к пригодности электрофоретической системы в условиях НВУ и ВУ, разработанной методики определения содержания низкомолекулярных примесей (фрагментов) и негликозилированных частей молекул с использованием КГЭ представлены в Приложении 2 (опубликовано на сайте журнала²⁶). В качестве рабочей была выбрана концентрация 1 мг/мл. Проверку разделительной способности электрофоретической системы в условиях НВУ

Таблица 3. Оценка чистоты препаратов моноклональных антител (МАТ), выполненная методом капиллярного электрофореза

Table 3. Results of comparative assessment of the purity of some studied MATs, determined under reducing and non-reducing conditions (assessed by the internal normalization method), %

Международное непатентованное наименование МАТ	Срок годности испытуемых МАТ	Результаты, полученные по платформенной методике		Результаты, полученные по оригинальным методикам производителей	
		Невосстанавливающие условия. Содержание интактного иммуноглобулина, %	Восстанавливающие условия. Суммарное содержание легкой и тяжелой цепей, %	Невосстанавливающие условия. Содержание интактного иммуноглобулина, %	Восстанавливающие условия. Суммарное содержание легкой и тяжелой цепей, %
Даратумумаб (МАТ № 1)	2019 г.	96,6	96,5	97,3	97,3
Дупилумаб № 1 (МАТ № 2)	2022 г.	93,7	95,1	94,5	96,9
Пембролизумаб № 1 (МАТ № 3)	2023 г.	98,9	97,1	99,2	98,4
Пембролизумаб № 2 (МАТ № 4)	2026 г.	96,6	97,9	97,1	97,8
Устекинумаб (МАТ № 5)	2020 г.	96,0	97,6	97,0	98,4

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

²⁶ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex2>

предложено проводить по раствору СО МАТ, подвергнутому стрессовому воздействию (в результате которого увеличивается содержание фрагмента негликозилированной тяжелой цепи), что позволяет оценить степень разрешения между пиками негликозилированной цепи и мономера. В ВУ разделительная способность системы оценивается по стандартному раствору МАТ, полученному в условиях, аналогичных для испытуемого образца (для ВУ), путем оценки разрешения между пиками легкой и тяжелой цепей. Чувствительность системы в НВУ и ВУ подтверждается по раствору, содержащему анализируемое МАТ в концентрации, соответствующей ПКО.

Последовательность ввода испытуемых образцов. Каждый из растворов, приготовленных в НВУ и ВУ, вводили в количествах кратных «*n*» в нижеприведенной последовательности: холостой раствор (*n*=1), раствор для оценки чувствительности (*n*=1), раствор сравнения (*n*=3), раствор для проверки пригодности электрофоретической системы (*n*=1), испытуемый раствор (*n*=3), раствор сравнения (*n*=1).

Электрофоретический профиль образцов в НВУ и ВУ (рис. 8. Электрофореграмма раствора даратумумаба в невосстанавливающих условиях; рис. 9. Электрофореграмма раствора даратумумаба в восстанавливающих условиях, Опубликован на сайте журнала (Приложение 1)²⁷) представлял собой хорошо разделенные целевые пики. Все электрофореграммы соответствовали требованиям пригодности электрофоретической системы: на электрофореграммах обнаруживался пик внутреннего СО с ММ 10 кДа с временем миграции менее 14,0 мин (12,3–12,9 мин); относительное стандартное отклонение скорректированных площадей основного пика / пика тяжелой цепи для трех последовательных вводов каждого исследуемого раствора (*n*=3) составляло не более 5,0% (0,096–1,410%); относительное стандартное отклонение времен миграции основного пика / пика тяжелой цепи для трех последовательных вводов исследуемого раствора (*n*=3) — не более 2,0% (0–0,413%); отношение пик/долина (*p/v*), рассчитанное для основного пика / пика тяжелой цепи и предшествующего ему пика примеси, — не менее 1,05; фактор симметрии основного пика / пика тяжелой цепи — не более 4,0 (1,14–3,42).

Обработка результатов и анализ результатов испытаний. Содержание примесей фрагментов и примесей ВМС рассчитывали методом внутренней нормализации скорректированных площадей в процентах от общей скорректированной площади всех пиков белковой природы на электрофореграмме. Интегрирование пиков во всех случаях проводилось по варианту с разметкой смежных, не полностью разделенных пиков и «плечевых» пиков примесей путем опускания перпендикуляра из разделяющей пики впадины или точки перегиба к общей базовой линии (как представлено на типичных электрофореграммах (рис. 8. Электрофореграмма раствора даратумумаба в невосстанавливающих условиях; рис. 9. Электрофореграмма раствора даратумумаба в восстанавливающих условиях. Приложение 1. Опубликованы на сайте журнала²⁸)). Не полностью разделенные пики примесей, имеющие общую базовую линию или не имеющие явной точки перегиба, интегрировали совместно и учитывали в любом случае, независимо от индивидуальной интенсивности каждого из таких пиков. Интегрировали и оценивали скорректированные по времени площади всех пиков, мигрирующих после пика внутреннего СО с молекулярной массой 10 кДа до окончания времени электрофоретического разделения (40 мин). Пик с молекулярной массой 10 кДа и сопутствующие пики, представляющие собой «всплески» базовой линии, в расчетах не учитывали.

Невосстанавливающие условия. На электрофореграммах испытуемого раствора и раствора сравнения идентифицировали основной пик как самый высокий пик на электрофореграмме. Пики с временами миграции, предшествующими основному пику, соответствовали пикам низкомолекулярных соединений. Пики с временами миграции, превышающими время миграции основного пика, соответствовали пикам высокомолекулярных соединений. Их интегрировали (рис. 8. Электрофореграмма раствора даратумумаба в невосстанавливающих условиях, Приложение 1. Опубликован на сайте журнала²⁹) и учитывали в расчетах.

Восстанавливающие условия. На электрофореграммах испытуемого раствора и раствора сравнения идентифицировали пики легкой и тяжелой цепей. Неидентифицированные пики с временами миграции, предшествующими пику тяжелой цепи, соответствовали пикам НМС, с временами

²⁷ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>

²⁸ Там же.

²⁹ Там же.

миграции, превышающими время миграции пика тяжелой цепи, — пикам ВМС.

В НВУ и в ВУ случаях, когда на электрофореграммах присутствовал пик негликозилированной тяжелой цепи, его относили и нормировали как пик НМС. Все вышеперечисленные пики примесей интегрировали (рис. 9. Электрофореграмма раствора даратумумаба в восстанавливающих условиях, Опубликовано на сайте журнала (Приложение 1)³⁰) и учитывали в расчетах.

Сопутствующие пики «всплесков» базовой линии представляют собой пики, имеющие характерную форму с острыми вершинами, отличную от формы пиков примесей и основных пиков (обладающих гауссоидальной формой и плавной вершиной). Сопутствующие пики считаются допустимыми, если присутствуют в качестве единичных пиков, не интерферируют с целевым пиками, подлежащими оценке, и не мешают их интегрированию.

Валидация методики определения родственных примесей (фрагментов) методом капиллярного гель-электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Данные по валидации были получены двумя аналитиками на разных единицах приборов в разные дни.

Специфичность. Для оценки специфичности методики сравнивали получаемые электрофоретические профили и содержание целевых примесей, определенных с использованием платформенной и оригинальной методик. Значимых отличий между профилями и содержанием примесей выявлено не было. На электрофореграммах растворов плацебо не было обнаружено пиков с временами миграции, совпадающими с временами миграции целевых пиков исследуемых образцов.

Для оценки *предела обнаружения (ПО)* были приготовлены образцы с концентрацией белка 0,003 мг/мл (0,3% от концентрации испытуемого раствора) и 0,005 мг/мл (0,5% от концентрации испытуемого раствора) для НВУ и ВУ соответственно. Для раствора ПО были получены значения соотношения сигнал/шум от 12 до 15 (НВУ) и от 13 до 17 (по пику тяжелой цепи) (ВУ).

Для оценки *предела количественного определения (ПКО)* были приготовлены образцы с концентрацией белка 0,005 мг/мл (0,5% от концентрации испытуемого раствора) и 0,0075 мг/мл (0,75% от концентрации испытуемого раствора) для НВУ и ВУ, соответственно (рис. 10.

Электрофореграмма раствора ПКО в невосстанавливающих условиях; рис. 11. Электрофореграмма раствора ПКО в восстанавливающих условиях. Опубликовано на сайте журнала (Приложение 1)³¹. По результатам оценки чувствительности в НВУ для раствора ПКО были получены значения соотношения сигнал/шум от 20 до 32; в ВУ по пику тяжелой цепи — от 27 до 39.

Линейность методики определяли путем оценки коэффициента детерминации (r^2) линейной регрессии зависимости отклика детектора (по основным пикам) от концентрации испытуемого раствора в диапазоне 0,5–300%. Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием линейной модели.

Оценку *линейности и аналитического диапазона* методики проводили, основываясь на результатах собственных экспериментов и общепринятых нормах содержания примесей низко- и высокомолекулярных соединений, определяемых методами КГЭ (суммарно не более 5–7%). При оценке верхней границы аналитического диапазона опирались на рабочие концентрации МАТ испытуемых/стандартных растворов, принятых в оригинальных методиках — 300% (3 мг/мл) от номинальной концентрации (1 мг/мл). Оценка линейности проводилась аналогично методу ЭХ — в трех диапазонах: нижнем, верхнем и объединенном. Данные линейности нижнего диапазона (в области 0,5–7,0%) получены с использованием 5 точек концентраций; верхнего диапазона (в области 80–300%) получены с использованием 8 точек концентраций; объединенного — 13 точек концентраций. В верхнем диапазоне были приготовлены образцы с концентрациями от 80 до 300% (0,8–3,0 мг/мл) относительно целевой концентрации 1 мг/мл для НВУ и ВУ с точками концентраций 80, 90, 100, 110, 120, 150, 200 и 300%. В нижнем диапазоне концентраций были приготовлены образцы с концентрациями: НВУ от 0,5% (0,005 мг/мл), ВУ 0,75% (0,0075 мг/мл) до 7,0% (0,070 мг/мл (для НВУ и ВУ)) относительно целевой концентрации 1 мг/мл. Объединенные точки концентраций составили: 0,5% (для НВУ) и 0,75% (для ВУ), 80, 90, 100, 110, 120, 150, 200 и 300%.

Для каждой точки концентрации каждым аналитиком готовились по 3 независимые пробы с индивидуальной пробоподготовкой. Статистическую обработку проводили

³⁰ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>

³¹ Там же.

по результатам измерения шести независимых проб, одной серии образца каждой из указанных ниже концентраций.

Все зависимости отклика детектора от концентрации линейны, отвечают условию $r \geq 0,99$, что подтверждает линейность данной методики. Аналитический диапазон методики составляет 0,5–300% для НВУ и 0,75–300% для ВУ.

Данные по линейности представлены в Приложении 3 (опубликовано на сайте журнала³²).

Оценку *правильности* методики определяли путем сравнения фактической концентрации и рассчитанной по градуировочному графику зависимости аналитического сигнала от концентрации в верхнем диапазоне концентраций (от 80 до 300%, суммарно для 8 концентрационных точек) (относительно теоретической). По полученным данным рассчитывали общее среднее арифметическое значение данных, полученных обоими аналитиками (суммарно для 48 результатов). Правильность составила: в НВУ от 97,59 до 103,77% (в точке 1 мг/мл – 103, %); в ВУ: для тяжелой цепи от 98,11 до 102,55% (в точке 1 мг/мл – 101,24 %); для легкой цепи от 98,43 до 101,74 % (в точке 1 мг/мл – 101,39%); суммарно по тяжелой и легкой цепям – от 98,43 до 102,24%.

Прецизионность оценивали для концентраций верхнего диапазона, для 8 концентрационных точек: 80, 90, 100, 110, 120, 150, 200 и 300 % от целевой концентрации (1 мг/мл). Статистическую обработку проводили по результатам измерения шести независимых проб, одной серии образца каждой из указанных концентраций с индивидуальной пробоподготовкой каждым из аналитиков, в одних условиях разделения (в общей сложности для 48 результатов ($n=48$)). По полученным данным рассчитывали общее среднее арифметическое значение (между двумя аналитиками), среднее квадратичное отклонение и *RSD*. *RSD* составили:

- НВУ – абсолютное время миграции 0,09–0,18%; относительное содержание интактного иммуноглобулина 0,14–1,01%;
- ВУ – абсолютное время миграции тяжелой цепи 0,14–1,00%, легкой цепи 0,15–1,02%; относительное содержание: тяжелой цепи 0,28–1,0 %, легкой цепи 0,37–0,8%, суммы тяжелой и легкой цепей 0,30–0,75%, что соответствует установленному допустимому разбросу значений по оцениваемым параметрам «не более 5%».

Устойчивость методики оценивали путем варьирования температуры термостата для хранения образцов (20, 25 °С) и сменой капилляра на идентичный, но другой серии, Uncoated Capillary (внутренний диаметр 50 мкм, общая длина 30,2 см из набора SDS-MW Analysis Kit (эффективная длина 20 см), кат. №338451, Lot. M304684, Beckman Coulter), апертура 100×200 мкм. Анализировали по 3 параллельно приготовленным образцам с концентрациями 1,0 мг/мл (НВУ) и 0,8 мг/мл (ВУ).

Устойчивость оценивали по соответствию скорректированных площадей и времен миграции допустимому диапазону, установленному по результатам валидации. Была показана устойчивость методики при варьировании температуры термостата для образцов от 20 до 25 °С, а также при использовании разных лотов идентичных капилляров.

ВЫВОДЫ

Таким образом, нами разработаны методики для определения родственных примесей с использованием методов эксклюзионной ВЭЖХ, капиллярного электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях в препаратах МАТ, которые были апробированы для МАТ 28 различных МНН российского и зарубежного производства.

Разработаны критерии оценки пригодности хроматографических и электрофоретических систем для выбранных условий испытаний.

Валидационные характеристики разработанных методик (специфичность, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность, устойчивость) соответствовали установленным критериям приемлемости. Для методики определения ВМС в МАТ методом эксклюзионной хроматографии прецизионность (*RSD*) определения площадей пиков составила: для мономера – до 0,4%, для групп агрегатов – до 8%, для общей площади пиков – до 0,4%, для относительной площади мономера – 0,02%. Линейность методики подтверждена в линейном диапазоне 0,5–120%, правильность – в диапазоне концентраций 99,1–102,1%, предел количественного определения методики составил 0,1%.

Для методики оценки чистоты МАТ метода капиллярного гель-электрофореза в ВУ и НВУ с определением содержания

³² <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex3>

иммуноглобулина, тяжелых и легких цепей, примесей низко- и высокомолекулярных фрагментов, а также негликозилированных фрагментов МАТ, с использованием метода капиллярного гель-электрофореза в ВУ и НВУ: прецизионность составила до 1,0% для относительного содержания основных пиков и до 1,0% для абсолютных времен миграции основных пиков. Линейность методики подтверждена в диапазоне концентраций 0,5–300%, правильность – 97,6–103,7%. Предел количественного определения – 0,5%.

Предлагаемые универсальные методики испытаний могут быть применены на любом этапе жизненного цикла продукта: при производстве (в ходе контроля очистки продукта, этапов хранения очищенного белка или других промежуточных продуктов); при испытаниях фармацевтической субстанции и ЛП (при выпускающем контроле и исследовании стабильности); при валидации производственного процесса; при подтверждении биоаналогичности (аналитической сопоставимости); при оценке сопоставимости производственных процессов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lu RM, Hwang YC, Liu JJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):1. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
2. Carrara SC, Ulitzka M, Grzeschik J, Kornmann H, Hock B, Kolmar H. From cell line development to the formulated drug product: The art of manufacturing therapeutic monoclonal antibodies. *Int J Pharm.* 2021;594:120164. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120164>
3. Mou X, Yang X, Li H, Ambrogelly A, Pollard D. A high throughput ultra performance size exclusion chromatography assay for the analysis of aggregates and fragments of monoclonal antibodies. *Pharm Bioprocess.* 2014;2(2):141–56.
4. Hernández-Jiménez J, Martínez-Ortega A, Salmerón-García A, Cabeza J, Prados JC, Ortiz R, et al. Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles. *Int J Biol Macromol.* 2018;118(A):511–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.105>
5. Kumar R, Guttman A, Rathore AS. Applications of capillary electrophoresis for biopharmaceutical product characterization. *Electrophoresis.* 2022;43(1–2):143–66. <https://doi.org/10.1002/elps.202100182>
6. Zhang J, Burman S, Gunturi S, Foley JP. Method development and validation of capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for the characterization of a monoclonal antibody. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53(5):1236–43. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.07.029>
7. Kaur H, Beckman J, Zhang Y, Jian Li Z, Szigeti M, Guttman A. Capillary electrophoresis and the biopharmaceutical industry: Therapeutic protein analysis and characterization. *TrAC Trend Anal Chem.* 2021;144:116407. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116407>
8. Szabo M, Sarkozy D, Szigeti M, Farsang R, Kardos Z, Kozma A, et al. Introduction of a capillary gel electrophoresis-based workflow for biotherapeutics characterization: Size, charge, and N-Glycosylation variant analysis of bamlanivimab, an anti-SARS-CoV-2 product. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:839374. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.839374>
9. Rauniyar N. Characterization of product related variants in therapeutic monoclonal antibodies. *LCGC Int.* 2024;1(6). <https://doi.org/10.56530/lcgc.int.ap3874j8>
10. Dadouch M, Ladner Y, Perrin C. Analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis: Sample preparation, separation and detection. *Separations.* 2021;8(1):4. <https://doi.org/10.3390/separations8010004>
11. Li M, Yu C, Wang W, Wu G, Wang L. Interlaboratory method validation of capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) methodology for analysis of mAbs. *Electrophoresis.* 2021;42(19):1900–13. <https://doi.org/10.1002/elps.202170122>
12. Alhazmi HA, Albratty M. Analytical techniques for the characterization and quantification of monoclonal antibodies. *Pharmaceuticals.* 2023;16(2):291. <https://doi.org/10.3390/ph16020291>

Дополнительная информация. Приложения 1, 2, 3 размещены на сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств». <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex2>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex3>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.А. Ваганова — концепция работы, написание и оформление текста рукописи; Р.С. Смирнов, С.А. Ленин, К.С. Фунташев — разработка методик испытаний, валидация методик; А.А. Костромских — разработка плана валидационных мероприятий; А.С. Перегудова, Д.А. Кадыкова — участие в валидационных мероприятиях; В.А. Меркулов — утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Additional information. Appendices 1, 2, 3 are published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.

<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex1>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex2>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346-annex3>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Olga A. Vaganova elaborated the concept, drafted and formatted the manuscript. Roman A. Smirnov, Sergei A. Lenin, Kirill S. Funtashev performed development and validation of analytical procedure. Anastasia A. Kostromskikh developed validation plan. Alexandra S. Peregudova, Darya A. Kadykova performed validation of analytical procedures. Vadim A. Merkulov approved the final version of the article for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Ваганова Ольга Александровна, канд. фарм. наук / **Olga A. Vaganova**, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2904-7382>

Смирнов Роман Сергеевич, канд. хим. наук / **Roman S. Smirnov**, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8593-1944>

Ленин Сергей Андреевич / **Sergei A. Lenin**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-9808-5760>

Фунташев Кирилл Сергеевич / **Kirill S. Funtashev**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-6074-3318>

Костромских Анастасия Андреевна, канд. хим. наук / **Anastasia A. Kostromskih**, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5588-5801>

Перегудова Александра Сергеевна / **Aleksandra S. Peregodova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8187-1008>

Кадыкова Дарья Алексеевна / **Darya A. Kadykova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-9087-0630>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. / **Vadim A. Merkulov**, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 30.01.2025

После доработки 28.04.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Received 30 January 2025

Revised 28 April 2025

Accepted 6 June 2025