

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-2-77-85>



УДК 577.11

Разработка и валидация метода определения специфической активности рекомбинантного моноклонального антитела экулизумаб

**Д.И. Зыбин^{1,*}, А.С. Серегин², А.Д. Аскретков¹, Н.В. Орлова², Ю.А. Серегин²,
А.И. Простякова³, Д.В. Капустин³**

¹ООО «ФАРМАПАРК», Москва, 117246 Россия

²НИЦ «Курчатовский институт – ГосНИИ Генетика», Москва, 117545 Россия

³Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,
Российская академия наук, Москва, 117997 Россия

*Автор для переписки, e-mail: zybin@pharmapark.ru

Цели. При подтверждении биоподобности препаратов необходимо создание надежных и точных аналитических методов сравнительных исследований для доказательства схожести препаратов по результатам физико-химических, биологических (*in vitro*), доклинических и клинических испытаний. Основной задачей настоящей работы является разработка и валидация метода определения специфической активности рекомбинантного моноклонального антитела экулизумаб.

Методы. В работе использован метод непрямого иммуноферментного анализа.

Результаты. Впервые разработан метод определения специфической активности гуманизированного рекомбинантного моноклонального антитела экулизумаб и проведена его валидация. С использованием разработанного метода проведена сравнительная оценка специфической активности оригинального препарата Солирис® (Alexion Pharmaceuticals Inc., USA) и его биоаналога PRK-001 (ООО «Фармапарк», Россия).

Выводы. Доказана биоаналогичность препаратов Солирис® и PRK-001 в отношении их специфической активности.

Ключевые слова: валидация, воспроизведенный лекарственный препарат, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, специфическая активность *in vitro*, иммуноферментный анализ, система комплемент.

Для цитирования: Зыбин Д.И., Серегин А.С., Аскретков А.Д., Орлова Н.В., Серегин Ю.А., Простякова А.И., Капустин Д.В. Разработка и валидация метода определения специфической активности рекомбинантного моноклонального антитела экулизумаб. *Тонкие химические технологии*. 2020;15(2):77-85. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-2-77-85>

Development and validation of a method for the determination of the specific activity of recombinant monoclonal antibody eculizumab

Dmitry I. Zybin^{1,®}, Aleksandr S. Seregin², Aleksandr D. Askretkov¹, Natalya V. Orlova², Yuri A. Seregin², Anna I. Prostyakova³, Dmitry V. Kapustin³

¹PHARMAPARK, Moscow, 117246 Russia

²Scientific Center "Kurchatov Institute," Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, 117545 Russia

³M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

®Corresponding author, e-mail: zybin@pharmapark.ru

Objectives. Developing reliable and accurate analytical methods is necessary for comparative pharmaceutical analysis using physicochemical, biological (in vitro), preclinical, and clinical trials. The main objective of this study was to develop and validate an in vitro method for determining the specific activity of the recombinant monoclonal antibody eculizumab.

Methods. The method of indirect enzyme immunoassay was used in the study.

Results. A method for determining the specific activity of the humanized recombinant monoclonal antibody eculizumab was described and validated for the first time. A comparative evaluation of the specific activity of Soliris® (Alexion Pharmaceuticals Inc., USA), and its biosimilar PRK-001 (Pharmapark, Russia) was performed using the developed method.

Conclusions. The similarity of PRK-001 and the original Soliris® in relation to their specific activity, that is, binding to the human complement system C5 protein, was proved.

Keywords: validation; paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; reproduced drug; specific in vitro activity; enzyme-linked immunosorbent assay; complement system.

For citation: Zybin D.I., Seregin A.S., Askretkov A.D., Orlova N.V., Seregin Yu.S., Prostyakova A.I., Kapustin D.V. Development and validation of a method for determination of the specific activity of recombinant monoclonal antibody eculizumab. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2020;15(2):77-85. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-2-77-85>

ВВЕДЕНИЕ

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) – чрезвычайно редкое заболевание (в среднем 3 случая на 1 миллион [1]), часто сопровождающееся серьезными осложнениями, такими как гемолитическая анемия, тромбоз в атипичных участках, костномозговая недостаточность, почечная недостаточность. Этиологию ПНГ связывают с соматической мутацией в гене PIG-A, приводящей к блокированию биосинтеза гликозилфосфатидилинозитола, гликолипида, называемого ГФИ-якорь, необходимого для удерживания ряда белков на клеточной мембране, в частности CD55 и CD59, которые являются ингибиторами мембран-атакующего комплекса (МАК) системы комплемента. Дефицит CD55 и CD59 на поверхности клеточной мембраны приводит к нарушению подавления образования МАК, что является главной причиной гемолиза эритроцитов при ПНГ [2, 3]. Это определяется при помощи проточной цитометрии [4, 5].

На данный момент для терапии ПНГ используется единственно доступный коммерческий препарат – Солирис® (Alexion Pharmaceuticals Inc., США). Действующим веществом в указанном препарате является рекомбинантное каппа-моноклональное антитело смешанного IgG2/4 типа – экулизумаб, состоящее из человеческой константной цепи и определяющее комплементарность мышинных участков, привитых на человеческие каркасные области в варибельной и тяжелой цепи, с суммарной молекулярной массой молекулы в 148 kDa¹. Механизм действия Экулизумаба заключается в связывании с белком C5 системы комплемента с последующим его литическим разрушением в лизосомах, что блокирует образование мембраноатакующего комплекса и последующий лизис клеток [6–8].

Ввиду высокой стоимости терапии (600 000 долларов США в год для одного пациента) [9] и

¹ DRUGBANK. Eculizumab. URL: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01257> [Дата обращения 22.10.2019].

необходимости в ее пожизненном проведении, увеличивается число фармацевтических компаний, активно занимающихся разработкой биоаналога препарата Солирис® (*Generium Pharmaceutical*, Россия; *Samsung Bioepis*, Южная Корея; *Amgen*, США), в связи с чем становится очевидна потребность в разработке надежных методов контроля качества получаемого продукта. Одним из наиболее важных показателей качества, несомненно, является его активность, т.е. связывание с белком C5 [10–12].

В настоящее время в литературе не описан метод, позволяющий оценивать специфическую активность моноклонального антитела экулизумаб с достаточным уровнем точности и воспроизводимости результатов на всех этапах производства. Стоит отметить, что на рынке представлен коммерческий набор Soliris/Eculizumab ELISA Kit (*Arsh Biotech Pvt. Ltd.*, Индия), с помощью которого (по заявлению авторов) возможно оценивать активность препарата в биологических жидкостях. Однако, в организме человека основная часть молекул экулизумаба связана с антигеном, оценить его содержание и активность с требуемым уровнем точности без применения дополнительных этапов пробоподготовки, не описанных производителями указанного набора, невозможно. Кроме того, не ясно, эффективно ли применение набора на различных этапах производства препарата, в частности, после проведения стадий выделения, очистки и фильтрации, которые могут существенно влиять на свойство конечного продукта.

В настоящей работе представлен новый метод определения специфической активности экулизумаба, который пригоден как для проведения контроля качества препарата на различных этапах разработки, так и для осуществления выходного контроля готового продукта. Проведена его валидация. Предложенный нами метод использован для сравнительной оценки специфической активности трех серий препаратов Солирис® (*Alexion Pharmaceuticals Inc.*, США) и PRK-001 (*ООО «Фармапарк»*, Россия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разработанная в данном исследовании методика количественной оценки специфической активности экулизумаба методом иммуноферментного анализа (ИФА) предусматривает использование стандартного образца экулизумаба с подтвержденным производителем значением специфической активности. В качестве образца сравнения в работе использовали препарат Солирис® (*Alexion Pharmaceuticals Inc.*, США).

Приготовление стандартных растворов

Приготовление фосфатно-солевого буферного раствора («Буферный раствор А»)

Одну таблетку сухого готового буфера (*Sigma Aldrich*, США) растворяли в 100 мл деионизован-

ной воды, pH полученного раствора доводили, при необходимости, до 7.4 с использованием pH-метра (*Mettler Toledo*, США). Полученный раствор хранили в плотно закрытой емкости, при температуре +4 °С.

Приготовление фосфатно-солевого буферного раствора с 0.01% Tween 20 («Буферный раствор Б»)

Одну таблетку сухого готового буфера, содержащего 0.01% Tween 20 (*Sigma Aldrich*, США) растворяли в 500 мл деионизованной воды при постоянном перемешивании при температуре 25 °С. pH полученного раствора доводили, при необходимости, до 7.4. Полученный раствор хранили в плотно закрытой емкости, при температуре +4 °С.

Приготовление холостого раствора

1 г бычьего сывороточного альбумина (*Sigma Aldrich*, США) растворяли в 100 мл буферного раствора А. Далее раствор хранили в плотно закрытой таре при температуре +4 °С.

Иммобилизация белка C5 на ИФА планшете

Раствор белка C5 (*Complement Technology*, США) разбавляли до концентрации 1.5 мкг/мл белка C5 при помощи буферного раствора А. По 100 мкл полученного раствора вносили в лунки планшета и инкубировали в течение 48 ч при температуре +4 °С.

Приготовление градуировочных растворов

Препарат Солирис® со специфической активностью 9138000 МЕ на 300 мг разводили холостым раствором, согласно Табл. 1.

Приготовление раствора вторичных антител

Рабочий раствор вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена разводили холостым раствором согласно рекомендации производителя (*Genway Biotech Inc.*, США).

Определение специфической активности экулизумаба

Исследуемый раствор экулизумаба, разведенный в холостом растворе, и градуировочные растворы S1–S6 вносили в лунки планшета с предварительно иммобилизованным белком C5 в количестве 100 мкл на лунку в трех повторах каждый. Планшет инкубировали в течение 2 ч при 4 °С. Далее лунки планшета промывали буферным раствором Б по 200 мкл в трех повторах для удаления матрикса образца. В лунки планшета вносили по 100 мкл раствора вторичных антител и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. После инкубации лунки промывали буферным раствором Б по 200 мкл в трех повторах для удаления не связавшихся антител. После удаления буферного раствора Б в лунки планшета вносили по 100 мкл готового раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, содержащего перекись водорода (*Sigma Aldrich*, USA). Планшет инкубировали в течение 10 мин 25 °С, и останавливали реакцию 0.5 М раствором серной кислоты (*ХИММЕД*, Россия). Измерение оптической

плотности при 450 нм и 650 нм (референс) проводили на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite 200 Pro (*Tecan*, Швейцария). Осуществляли построение сигмоидальной кривой по градуировочным растворам экулизумаба в координатах оптическая плотность – активность. По уравнению, описывающему кривую проводили расчет активности экулизумаба в испытуемом образце.

Обработку результатов проводили при помощи программного обеспечения Origin 9.1 (*OriginLab Corp.*, США).

Валидация метода

Валидацию разработанного метода проводили в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV по следующим параметрам: специфичность; линейность; повторяемость; промежуточная прецизионность; правильность; аналитическая область и устойчивость.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе в лунках планшета получали комплекс «иммобилизованный белок C5 – экулизумаб». На втором этапе осуществлялось связывание вторичных антител, специфичных к Fc фрагменту IgG 4 типа и конъюгированных с пероксидазой хрена. На третьем этапе добавляли хромогенный реагент,

останавливали реакцию, определяли оптическую плотность. Схематическое изображение метода приведено на рис. 1.

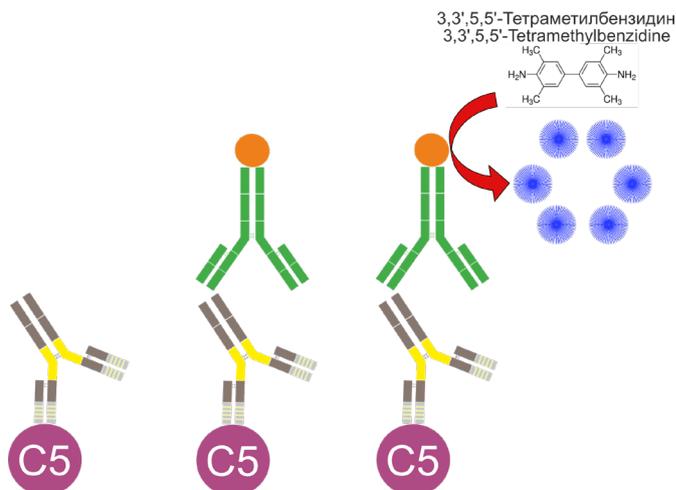


Рис 1. Схематическое изображение определения специфической активности экулизумаба.

Описание стадий метода приведено в тексте.

Fig 1. Schematic for determining the specific activity of eculizumab. The stages of the method are described in the text below.

Таблица 1. Разведение стандартного образца для приготовления градуировочных растворов
Table 1. Dilution of a standard sample for the preparation of calibration solutions

Наименование раствора Sample name	Объем образца, мкл Sample volume, µl	Объем холостого раствора, мкл Volume of blank solution, µl	Специфическая активность, МЕ/мл Specific activity, IU/ml
Образец ITD 1* Sample ITD 1*	10 мкл препарата Солирис® 10 µl of Soliris®	294.6	300 000
Образец ITD 2 Sample ITD 2	100 ITD1	900	30 000
Образец ITD 3 Sample ITD 3	100 ITD2	900	3000
Образец ITD 4 Sample ITD 4	100 ITD3	900	300
Образец S1 Sample S1	500 ITD4	500	150
Образец S2 Sample S2	500 S1	250	100
Образец S3 Sample S3	400 S2	400	50
Образец S4 Sample S4	400 S3	400	25
Образец S5 Sample S5	400 S4	400	12.5
Образец S6 Sample S6	400 S5	140	9.3

*Образцы с условным обозначением «ITD» используются в качестве промежуточных разведений.

*Samples labeled “ITD” are used as intermediate dilutions.

Оценка специфичности

Специфичность метода определяется способностью оценивать содержание исследуемого компонента на фоне сопутствующих веществ в растворе белка [13]. Для подтверждения специфичности метода исследовали влияние буферных растворов препаратов PRK-001 (далее образец SP1) и Солирис® (далее образец SP2), приготовленных в соответствии с инструкцией производителя. Параллельно оценивали влияние компонентов буферных растворов, используемых на каждом этапе очистки препарата (при использовании образца SP3 – буферного раствора после очистки с использованием аффинного сорбента, при использовании образца SP4 – буферного раствора после очистки с использованием ионообменного сорбента). Значение оптической плотности исследуемых растворов должно находиться в диапазоне ±10% от оптической плотности холостого раствора. Результаты исследования приведены в табл. 2.

Полученные результаты позволяют судить об отсутствии влияния вспомогательных компонентов веществ препарата на результаты анализа. Таким образом, специфичность метода установлена.

Оценка линейности метода

Настоящая методика не демонстрирует линейную зависимость при построении кривой в координатах «специфическая активность/оптическая плотность» в выбранном диапазоне (от 9.3 МЕ/мл до 150 МЕ/мл), поэтому для описания полученной зависимости использовали сигмоидальную кривую, описываемую уравнением [14, 15]:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(LOGx_0 - x) \times p}}$$

где A_1 , A_2 – асимптоты, полученные при описании зависимости; x – значение активности, МЕ/мл; p – коэффициент Хилла; x_0 – координата точки перегиба.

При построении градуировочной кривой использовались 6 стандартных растворов со следующими значениями специфической активности: 150, 100, 50, 25, 12.5, 9.3 МЕ/мл. Полученная кривая представлена на рис. 2. Коэффициент корреляции составил 0.9987, что не менее минимально-допустимого значения 0.99. Таким образом, линейность метода установлена.

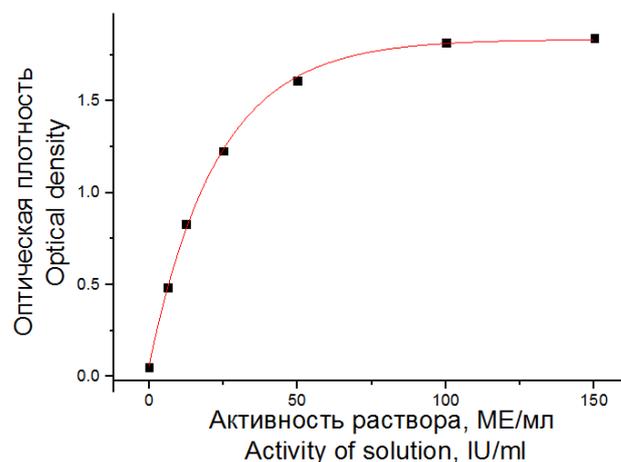


Рис 2. Полученная градуировочная кривая при оценке линейности метода.

Fig. 2. The calibration curve obtained when evaluating the linearity of the method.

Оценка повторяемости метода

Повторяемость метода оценивали, анализируя стандартные образцы со значениями специфической активности: 150, 25, 12.5 МЕ/мл в шести повторах каждый. Относительное стандартное отклонение (relative standard deviation – RSD) для каждого концентрационного уровня не должно превышать 3%. Результаты оценки повторяемости метода представлены в табл. 3. Значение относительного стандартного отклонения для всех концентрационных уровней не превышает 3%, что говорит о повторяемости метода.

Таблица 2. Результаты исследования специфичности метода
Table 2. Determination of method specificity

Наименование Sample name	Оптическая плотность* Optical density*	Оптическая плотность* холостого раствора Optical density* of blank solution
Образец SP1 Sample SP1	0.0154 ± 0.0004	0.0151 ± 0.0004
Образец SP2 Sample SP2	0.0153 ± 0.0004	
Образец SP3 Sample SP3	0.0151 ± 0.0003	
Образец SP4 Sample SP4	0.0155 ± 0.0004	

*Данные в таблице приведены в формате среднее значение ± стандартное отклонение (n = 3).

*The data in the table are given in the following format: average value ± standard deviation (n = 3).

Промежуточная прецизионность и правильность

Промежуточная прецизионность и правильность оценивалась путем проведения 6 аналитических сессий в течение 6 дней двумя операторами. В каждой аналитической сессии строилась градуировочная кривая и исследовались 5 испытуемых растворов со следующими значениями специфической активности: 150, 75, 37.5, 18.7, 9.3 МЕ/мл. Для установления правильности метода значение степени извлечения (*R*) не должно выходить за диапазоны 85–115%. Промежуточная прецизионность метода считается установленной, если RSD по результатам 6 сессий для каждого концентрационного уровня не превышает 15%. Результаты оценки промежуточной прецизионности и правильности представлены в табл. 4.

Полученные результаты удовлетворяют требованиям, таким образом, промежуточная прецизионность и правильность метода установлены.

Оценка аналитической области

Аналитическую область метода оценивали исходя из результатов, полученных при определении линейности, повторяемости и правильности метода в диапазоне активности 9.3–150 МЕ/мл. Так как методика удовлетворяет всем валидационным требованиям, можно считать, что аналитическая область метода находится в диапазоне 9.3–150 МЕ/мл.

Оценка устойчивости

Наиболее критическим параметром метода, который может оказать влияние на результат, является

срок хранения планшета с иммобилизованным белком С5. Для оценки устойчивости метода планшеты с иммобилизованным белком С5 инкубировали при 4 °С в течение 7 и 14 суток, после чего проводили анализ испытуемого образца с параллельным проведением анализа в планшете (время хранения 0 суток). Результаты определения активности в планшетах, подвергнутых хранению, сравнивали с результатами, полученными в планшете без длительного хранения.

Отклонение результатов активности испытуемого образца, полученных в планшетах, подвергнутых хранению, как в течение 7, так и в течение 14 суток, не превышали установленного предела ($\pm 5\%$) от истинного значения, что говорит об устойчивости метода по параметру срок хранения планшета с иммобилизованным белком С5.

Сравнительное исследование специфической активности препаратов PRK-001 и Солирис®

Препарат производства компании ООО «Фармапарк» – PRK-001 является воспроизведенным биологическим лекарственным средством. Таким образом, необходимо подтвердить его сходство с оригинальным биологическим лекарственным препаратом [16]. В настоящей работе проведена сравнительная оценка специфической активности трех серий препаратов Солирис® и PRK-001 для подтверждения качества полученного биоаналога. В качестве стандартного образца использовали Солирис® серии 1000325 с известным значением активности.

Таблица 3. Результаты исследования повторяемости метода
Table 3. Results of the method repeatability study

Теоретическая специфическая активность образца, МЕ/мл Theoretical specific activity of the sample, IU/ml	Значение измеренной специфической активности образца*, МЕ/мл The value of the measured specific activity of the sample*, IU/ml	RSD, %
150	154.9 ± 4.4	2.8
25	25.5 ± 0.7	2.5
12.5	12.3 ± 0.1	0.8

*Данные в таблице приведены в формате среднее значение ± стандартное отклонение (*n* = 6).

*The data in the table are given in the format average value ± standard deviation (*n* = 6).

Таблица 4. Результаты оценки промежуточной прецизионности и правильности метода
Table 4. Evaluation of the intermediate precision and accuracy of the method

Теоретическая специфическая активность образца, МЕ/мл Theoretical specific activity of the sample, IU/ml	Значение измеренной специфической активности образца*, МЕ/мл The value of the measured specific activity of the sample*, IU/ml	RSD (<i>n</i> = 6), %	<i>R</i> , %
150.0	157.3 ± 15.3	9.7	104.9
75.0	75.9 ± 6.0	7.9	101.2
37.5	37.5 ± 2.2	5.9	100.0
18.7	19.9 ± 1.7	8.5	106.1
9.3	9.3 ± 0.9	8.7	108.1

*Данные в таблице приведены в формате среднее значение ± стандартное отклонение (*n* = 6).

*The data in the table are given in the format average value ± standard deviation (*n* = 6).

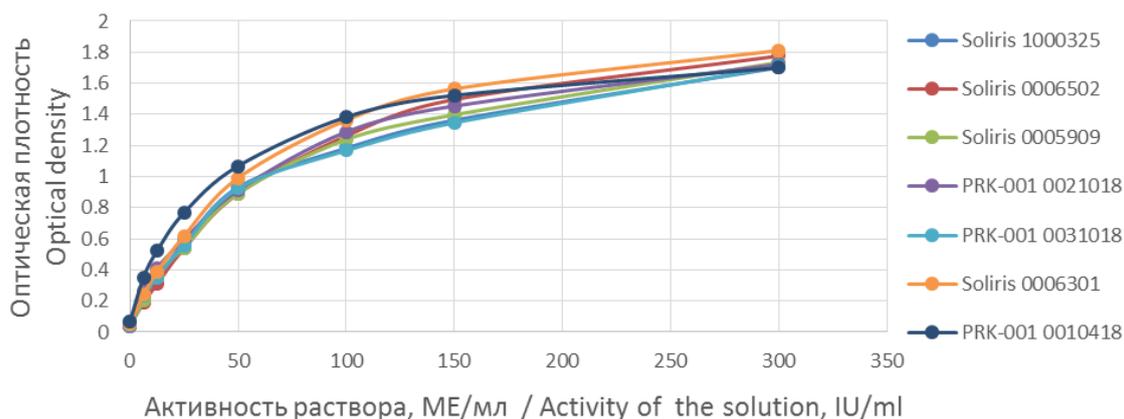


Рис. 3. График зависимости «оптическая плотность – специфическая активность (связывание)», полученный для препаратов Солирис® (серии 0006502, 0005909, 0006301) и PRK-001 (серии 0010418, 0021018 и 0031018) в сравнении с препаратом Солирис® серии 1000325.

Fig. 3. “Optical density-specific activity (binding)” dependence plot obtained for Soliris® (Series 0006502, 0005909, and 0006301) and PRK-001 (Series 0010418, 0021018, and 0031018) in comparison with Soliris® Series 1000325.

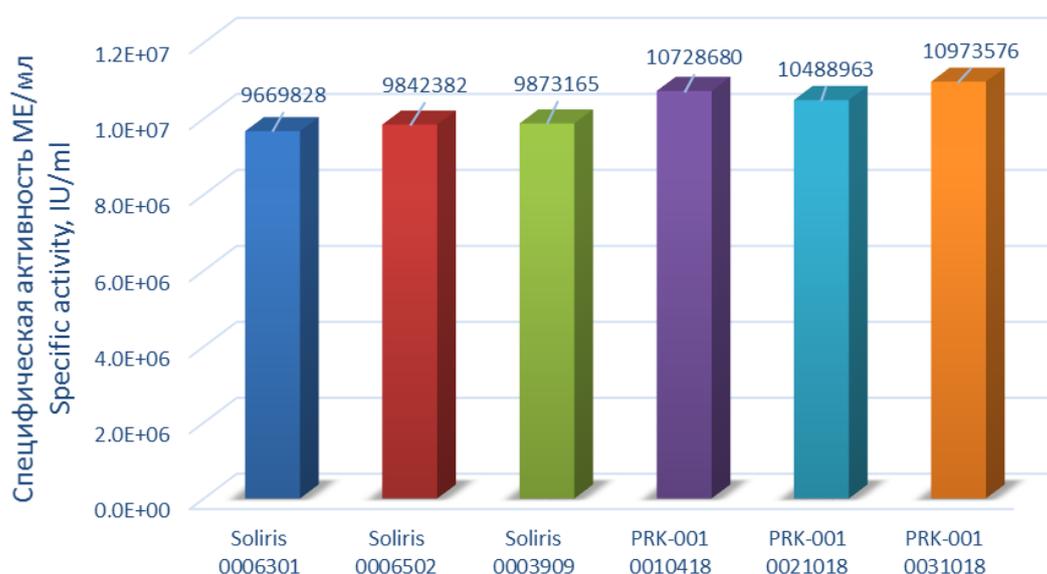


Рис. 4. Сравнение специфической активности трех серий препаратов Солирис® и PRK-001.

Fig. 4. Specific activity of three series Soliris® and PRK-001.

На рис 3. представлены кривые зависимости оптической плотности от специфической активности всех исследуемых в работе препаратов.

Для всех серий исследуемых препаратов была определена удельная специфическая активность с использованием разработанного метода. Результаты исследования приведены на рис. 4.

Полученные результаты подтверждают соответствие препаратов PRK-001 и Солирис® в отношении активности – связывании с белком С5 системы комплемента человека. Измеренная специфическая активность образцов Солириса® и PRK-001 отличалась не более чем на 9%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые описана и проведена валидация метода определения специфической активности гуманизированного рекомбинантного моноклонального антитела экулизумаб. Проведена сравнительная оценка воспроизведенного препарата PRK-001 и оригинального – Солирис®. Доказано сходство обоих препаратов в отношении их специфической активности.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Hill A., Platts P.J., Smith A. The incidence and prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and survival of patients in Yorkshire. *Blood*. 2006;108(11):985. <https://doi.org/10.1182/blood.V108.11.985.985>
- Pu J.J., Brodsky R.A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria from bench to bedside. *ClinTranslSci*. 2011;4(3):219-224. <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2011.00262.x>
- Devalet B., Mullier F., Chatelain B., Dogne J.M., Chatelain C. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *Eur. J. Haematol*. 2015;95(3):190-198. <https://doi.org/10.1111/ejh.12543>
- Höchsmann B., Rojewski M., Schrezenmeier H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes. *Ann. Hematol*. 2011;90(8):887-899. <https://doi.org/10.1007/s00277-011-1177-4>
- Brodsky R.A., Young N.S., Antonioli E. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2008;111(4):1840-1847. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-094136>
- Tegla C.A., Cudrici C., Patel S. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol. Res*. 2011;51(1):45-60. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8239-5>
- Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., Lambris J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol*. 2010;11(9):785-797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>
- Dubois E.A., Cohen A.F. Eculizumab. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 2009;68(3):318-319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03491.x>
- Khedraki R., Noor Z., Rick J. The Most Expensive Drug in the World: To Continue or Discontinue, That Is the Question. *Fed. Pract*. 2016;33(7):22-28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6366567/>
- Harder M. J., Kuhn N., Schrezenmeier H., et al. Incomplete inhibition by eculizumab: mechanistic evidence for residual C5 activity during strong complement activation. *Blood*. 2016;129(8):970-980. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-732800>
- Kelly R. J., Höchsmann B., Szer J., et al. Eculizumab in Pregnant Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med*. 2015;373(11):1032-1039. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502950>
- Wehling C., Amon O., Bommer M. Monitoring of complement activation biomarkers and eculizumab in complement-mediated renal disorders. *Clin. Exp. Immunol*. 2016;187(2):304-315. <https://doi.org/10.1111/cei.12890>
- Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). In: International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva. 2005;6-13.
- Tijssen P. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Canada: Elsevier Science; 1985. 548 p.
- Исакова О.П., Тарасевич Ю.Ю. Обработка и визуализация данных физических экспериментов с помощью пакета Origin. Учебно-методическое пособие. Астрахань: Издательство ОГОУ ДПО «АИПКП»; 2007. 67 с.
[Isakova O.P., Tarasevich Yu.Yu. *Obrabotka i vizualizatsiya dannykh fizicheskikh eksperimentov s pomoshch'yu paketa Origin* (Processing and visualization of physical experiment data using the Origin package). Educational and methodological guide. Astrakhan: DPO AIPKP Publ.; 2007; 67 p. (in Russ.).]
- Guideline on similar biological medicinal products. Committee for Medicinal Products for Human Use; 2014. 16 p. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1_en.pdf

Об авторах:

Зыбин Дмитрий Игоревич, старший химик-аналитик ООО «Фармапарк» (117246, Россия, Москва, Научный пр-д, д. 8, стр. 1). E-mail: zybin@pharmapark.ru. Researcher ID P-8049-2016, <https://orcid.org/0000-0002-5542-982X>

Серегин Александр Сергеевич, аспирант НИЦ «Курчатовский институт – ГосНИИГенетика» (117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1). E-mail: repnuey@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-5842-7344>

Аскретков Александр Дмитриевич, старший химик-аналитик ООО «Фармапарк» (117246, Россия, Москва, Научный пр-д, д. 8, стр. 1). E-mail: askretkov.a.d@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-0110-8323>

Орлова Наталья Владимировна, кандидат биологических наук, заведующий испытательной лабораторией НИЦ «Курчатовский институт – ГосНИИГенетика» (117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1). E-mail: orlova.chemist@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-4161-5880>

Серегин Юрий Александрович, кандидат биологических наук, заместитель директора НИЦ «Курчатовский институт – ГосНИИГенетика» (117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный пр-д, д. 1). E-mail: yuriy.seregin@pharmapark.ru. ResearcherID I-1874-2017

Простякова Анна Игоревна, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории полимеров для биологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10). E-mail: profan@list.ru. Researcher ID H-5123-2016, <https://orcid.org/0000-0001-5922-6600>

Капустин Дмитрий Валерьевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, руководитель лаборатории полимерных сорбентов Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10). E-mail: kapustin@ibch.ru. Researcher ID B-5773-2014, <https://orcid.org/0000-0002-5485-9297>

About the authors:

Dmitry I. Zybin, Chief Chemist-Analyst, PHARMAPARK LLC (8, b. 1, Nauchnyi proezd, Moscow, 117246, Russia). E-mail: zybin@pharmapark.ru. Researcher ID P-8049-2016, <https://orcid.org/0000-0002-5542-982X>

Aleksandr S. Seregin, Postgraduate Student, Scientific Center “Kurchatov Institute”, Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (1, 1st Dorozhnyi pr., Moscow, 117545, Russia). E-mail: penpney@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-5842-7344>

Aleksandr D. Askretkov, Chief Chemist-Analyst, PHARMAPARK LLC (8, b. 1, Nauchnyi proezd, Moscow, 117246, Russia). E-mail: askretkov.a.d@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-0110-8323>

Natalya V. Orlova, Cand. of Sci., Head of Research Laboratory, Scientific Center “Kurchatov Institute”, Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (1, 1st Dorozhnyi pr., Moscow, 117545, Russia). E-mail: orlova.chemist@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-4161-5880>

Yuri A. Seregin, Cand. of Sci., Deputy Director, Scientific Center “Kurchatov Institute”, Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (1, 1st Dorozhnyi pr., Moscow, 117545, Russia). E-mail: yuriy.seregin@pharmapark.ru. ResearcherID I-1874-2017

Anna I. Prostyakova, Cand. of Sci., Researcher, Laboratory of Polymers for Biology, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences (16/10, Miklukho-Maklaya ul., Moscow, 117997, Russia). E-mail: profan@list.ru. Researcher ID H-5123-2016, <https://orcid.org/0000-0001-5922-6600>

Dmitry V. Kapustin, Cand. of Sci., Head of Polymeric Sorbent Laboratory, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences (16/10, Miklukho-Maklaya ul., Moscow, 117997, Russia). E-mail: kapustin@ibch.ru. Researcher ID B-5773-2014, <https://orcid.org/0000-0002-5485-9297>

*Поступила: 01.11.2019; Получена после доработки: 12.03.2020; Принята к опубликованию: 13.04.2020.
Submitted: November 01, 2019; Reviewed: March 12, 2020; Accepted: April 13, 2020.*