

Валидация методики на основе биослойной интерферометрии для определения связывающих (общих) антител к ромиплостиму в сыворотке крови человека

А.А. Агафонова^{1,✉}, М.В. Жилыева², И.В. Лягоскин¹, А.А. Казаров¹, А.Е. Лисова¹, Р.Р. Шукуров¹

¹ Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», ул. Владимирская, д. 14, пос. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, 601125, Российская Федерация

² Общество с ограниченной ответственностью «ГЕНОТЕРА», ул. Маршала Рыбалко, д. 2, корпус 6, вн. тер. г. муниципальный округ Шукино, Москва, 123060, Российская Федерация

✉ Агафонова Алена Алексеевна; aaagafonova@generium.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В ряде случаев лечение ромиплостимом пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой сопряжено с образованием антилекарственных антител (АЛА), что часто приводит к развитию серьезных неблагоприятных явлений. Для определения связывающих (общих) АЛА (оАЛА) к ромиплостиму в сыворотке крови человека предлагается методика, основанная на биослойной интерферометрии. С технической точки зрения использующие данный принцип приборы имеют некоторые преимущества (высокая пропускная способность, увеличенные межсервисные интервалы, низкий уровень контаминации оборудования при анализе биообразцов) перед приборами на основе поверхностного плазмонного резонанса, которые применяются для мониторинга оАЛА при проведении клинических исследований оригинального препарата. Для обеспечения воспроизводимости измерений и стандартизации лабораторного этапа клинических исследований иммуногенности биоаналогичного препарата необходима валидация методики.

ЦЕЛЬ. Установить ключевые валидационные характеристики методики, основанной на биослойной интерферометрии, для определения общих антилекарственных антител к ромиплостиму в сыворотке крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Принцип метода заключается в детектировании специфического взаимодействия связывающих антител, содержащихся в исследуемых образцах, с иммобилизованным на поверхности стрептавидиновых биосенсоров биотинилированным ромиплостимом. Методика состоит из этапа скрининг-теста, в котором определяется наличие или отсутствие оАЛА в образцах; подтверждающего теста для проверки специфичности связывания оАЛА с ромиплостимом; этапа определения титра антител, то есть предельного разведения, при котором оАЛА могут быть обнаружены в образцах. В работе использовались положительные контрольные образцы, содержащие различные концентрации поликлональных кроличьих антител к ромиплостиму. Детектирование белкового комплексообразования проводилось в режиме реального времени с использованием интерферометра Octet® QKe.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Значения фактора биологической вариабельности и предельного значения незначимого ингибирования составили 1,481 и 34,2% соответственно. Подтверждены прецизионность и специфичность методики. Нижний предел детекции оАЛА в отсутствии ромиплостима составил 622 нг/мл. При оценке эффекта матрицы в скрининг-тесте аналитический сигнал 8 из 10 образцов сыворотки крови после добавления оАЛА увеличился более чем в 1,481 раза; в подтверждающем тесте значение показателя «процент ингибирования» превышало 34,2% при анализе 8 из 10 образцов с добавлением оАЛА. Эффект высокой дозы оАЛА в концентрации от 0,8 до 50 мкг/мл отсутствовал.

© А.А. Агафонова, М.В. Жилыева, И.В. Лягоскин, А.А. Казаров, А.Е. Лисова, Р.Р. Шукуров, 2025

Результаты определения оАЛА в скрининг-тесте были устойчивы к присутствию 1 нг/мл ромиплостима в образцах. Стрептавидиновые биосенсоры с иммобилизованным ромиплостимом сохраняли стабильность после 14 сут хранения при температуре 5 ± 3 °C и не менее 20 циклов регенерации.

ВЫВОДЫ. Анализ полученных результатов валидации подтвердил пригодность методики на основе биослойной интерферометрии для достоверного и воспроизводимого определения связывающих (общих) антител к ромиплостиму в сыворотке крови человека.

Ключевые слова: биослойная интерферометрия; связывающие антитела к ромиплостиму; валидация аналитической методики; клиническая разработка; биоаналогичный лекарственный препарат

Для цитирования: Агафонова А.А., Жилыева М.В., Лягоскин И.В., Казаров А.А., Лисова А.Е., Шукуров Р.Р. Валидация методики на основе биослойной интерферометрии для определения связывающих (общих) антител к ромиплостиму в сыворотке крови человека. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639>

Финансирование. Работа выполнена за счет финансовой поддержки АО «ГЕНЕРИУМ».

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Validation of a biolayer interferometry-based method for the determination of binding (total) antibodies to romiplostim in human serum

Alena A. Agafonova¹✉, Maria V. Zhilyaeva², Ivan V. Lyagoskin¹, Alexander A. Kazarov¹, Alena E. Lisova¹, Rakhim R. Shukurov¹

¹ GENERIUM JSC, 14 Vladimirskaia St., Volginsky, Petushinsky District, Vladimir region 601125, Russian Federation

² GENOTERA LLC, 2/6 Marshal Rybalko St., Municipal District Shchukino, Moscow 123060, Russian Federation

✉ Alena A. Agafonova; aaagafonova@generium.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Romiplostim treatment of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura is associated with formation of anti-drug antibodies (ADA), which often leads to the serious adverse events. A method based on biolayer interferometry is proposed for determination of binding (total) ADA (bADA) to romiplostim in human serum. From a technological point of view, instruments using this principle have some advantages (higher throughput, prolonged service intervals, low level of equipment contamination during analysis of biosamples) over those based on surface plasmon resonance, which are used to monitor bADA levels during clinical trials of the original drug. The method should be validated to ensure reproducibility of measurements and standardise clinical laboratory trials of the immunogenicity of a biosimilar drug.

AIM. To establish the key validation characteristics of a biolayer interferometry-based method for the determination of total anti-drug antibodies to romiplostim in human serum.

MATERIALS AND METHODS. The method is used to detect the specific interaction of binding antibodies with biotinylated romiplostim immobilised on the streptavidin-coated biosensors. The method includes a screening test to determine bADA presence or absence in the samples; a confirmatory test to check the specificity of bADA binding to romiplostim; determination of antibody titer and maximal dilution, that allows to detect bADA in the samples. Positive control samples containing different concentrations of polyclonal rabbit antibodies to romiplostim were used in the work. Detection of protein complex formation was performed in real time mode using an Octet® QKe interferometer.

RESULTS. The biological variability factor and the limit of not significant inhibition were 1.481 and 34.2%, respectively. The precision and specificity of the method were confirmed.

The lower limit of bADA detection in the absence of romiplostim was 622 ng/mL. The analytical signal of 8 out of 10 blood serum samples after the addition of bADA increased by more than 1.481 times when assessing the matrix effect in the screening test; the percentage inhibition value exceeded 34.2% when analysing 8 out of 10 samples with the addition of bADA in the confirmatory test. There was no high-dose effect at bADA concentrations from 0.8 to 50 µg/mL. The results of bADA determination in the screening test were robust to the presence of 1 ng/mL romiplostim in the samples. Streptavidin-coated biosensors with immobilised romiplostim maintained stability after 14 days of storage at a temperature of (5±3) °C and at least 20 regeneration cycles.

CONCLUSIONS. Analysis of the validation results obtained confirms the suitability of the method for reliable and reproducible determination of binding (total) antibodies to romiplostim in human serum.

Keywords: biolayer interferometry; romiplostim binding antibodies; assay validation; clinical development; biosimilar drug

For citation: Agafonova A.A., Zhilyaeva M.V., Lyagoskin I.V., Kazarov A.A., Lisova A.E., Shukurov R.R. Validation of a biolayer interferometry-based method for the determination of binding (total) antibodies to romiplostim in human serum. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639>

Funding. This study was funded by GENERIUM JSC.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП) – редкое аутоиммунное заболевание, характеризующееся низким количеством тромбоцитов. Использование препаратов агонистов тромбоцитарного рецептора, в число которых входит ромиплоstim, увеличивает продолжительность и улучшает качество жизни пациентов с ИТП [1, 2]. Вывод на фармацевтический рынок препарата ромиплоstim российского производства способствует большей доступности терапии нуждающимся в ней пациентам.

Ромиплоstim представляет собой гибридный белок, состоящий из Fc-фрагмента человеческого IgG1, C-конец каждой цепи которого ковалентно связан с пептидом, содержащим два фрагмента, которые взаимодействуют с тромбоцитарным рецептором. В клинических исследованиях оригинального препарата ромиплоstima выявление общих антилекарственных антител (оАЛА) проводили с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR). Вероятность развития клинически значимого иммунного ответа на данный препарат является низкой [3]. Однако образование АЛА может приводить

к развитию серьезных неблагоприятных явлений [4]. Поэтому при разработке биоаналогичного препарата необходимо изучить его иммуногенность с помощью надежной и устойчивой методики.

Международными регуляторными органами рекомендовано использование многоуровневого подхода к оценке оАЛА¹, который состоит из последовательных этапов: скрининг-теста, подтверждающего теста и оценки титра. Мониторинг изменения титра оАЛА помогает интерпретировать данные фармакокинетики, фармакодинамики и клинических наблюдений [5, 6].

Для обнаружения оАЛА используются различные методы, включая иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), электрохемилюминесцентный иммуноанализ (electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA), SPR и биослойную интерферометрию (bio-layer interferometry, BLI) [7]. По сравнению с ELISA и ECLIA метод BLI имеет более низкую чувствительность, но потенциально более устойчив к присутствию лекарственного препарата в анализируемых образцах [8] и позволяет обнаруживать низкоаффинные антитела, характерные для раннего иммунного ответа² [7, 9, 10].

¹ Immunogenicity testing of therapeutic protein products – developing and validating assays for anti-drug antibody detection. Guidance for industry. Center for Biologics Evaluation and Research, FDA; 2019.

EMA/CHMP/BMWP/14327/2006 Rev 1. Guideline on immunogenicity assessment of therapeutic proteins. EMA; 2017.

² Immunogenicity assessment of therapeutic protein on the Octet® BLI System. Technical note. Sartorius. <https://www.sartorius.com/resource/blob/1523320/b9e4c06d9543d580afc4b401cfec69ed/immunogenicity-assessment-bli-octet-technical-note-en-sartorius-pdf-260224--data.pdf>

В данной работе впервые в клинических исследованиях ромиплостима предлагается использовать BLI для определения оАЛА. С помощью метода BLI так же, как и SPR, можно детектировать образование белковых комплексов в режиме реального времени. Для измерительных приборов на основе SPR характерна проблема загрязнения сывороткой крови каналов, служащих для доставки образца на поверхность биосенсорного чипа. В BLI используется подход «dip-and-read», при котором биосенсоры погружаются в лунки планшета, содержащие образцы, что исключает описанную выше проблему [7, 9].

Цель работы — установить ключевые валидационные характеристики методики, основанной на биослойной интерферометрии, для определения общих антилекарственных антител к ромиплостиму в сыворотке крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Исследование было одобрено на заседании Межвузовского комитета по этике (Протокол № 2 от 20.02.2020) при АНО «Организационно-техническое обеспечение «МКЭ». Пробы периферической венозной крови забирали в пробирки Vacuette с активатором свертывания крови (кат. № 455059, Greiner Bio-One GmbH, Австрия) от здоровых добровольцев мужского пола в возрасте от 18 до 50 лет, не получавших лечение ромиплостимом. Для выделения сыворотки крови пробирки оставляли на 20–30 мин при комнатной температуре, после чего центрифугировали при 1800 g и 4 °C в течение 10 мин. Образцы сыворотки крови аликвотировали и хранили при температуре минус 80 °C до проведения анализа.

В качестве негативного контрольного образца (negative control, NC), заведомо не содержащего антилекарственных антител, использовали пулированную сыворотку крови человека «Normal human serum» (кат. № S1-100 ML, Merck Millipore, США).

Для приготовления положительных контрольных образцов (positive control, PC) в NC добавляли поликлональные кроличьи антитела, специфичные к ромиплостиму (получены в АО «ГЕНЕРИУМ»), до финальной концентрации 50 мкг/мл (очень высокий положительный контроль, VNPC), 10 мкг/мл (высокий положительный контроль, NPC), 2 мкг/мл (средний положительный контроль, MPC) и 0,8 мкг/мл (низкий положительный контроль, LPC).

Для приготовления контрольных образцов, содержащих неспецифические антитела, в NC добавляли моноклональные человеческие

антитела к омализумабу (кат. № HCA235, Bio-Rad, США) до финальной концентрации 10 мкг/мл или человеческие антитела класса G (кат. № ab98981, Abcam, Великобритания) — до 20 мкг/мл.

Для конъюгирования ромиплостима с биотином использовали биоаналогичный препарат Стимплейт (серия MW00120, АО «ГЕНЕРИУМ», Россия) или оригинальный препарат Энплейт (серия 1100215A, Amgen Europe B.V., Нидерланды) и набор для биотинилирования «Biotin (Type A) Fast Conjugation Kit» (кат. № ab201795, Abcam, Великобритания).

Для оценки специфичности подтверждающего теста использовали лекарственный препарат Луцентис® (серия SH275, Novartis Pharma Stein AG, Швейцария), содержащий ранибизумаб в качестве действующего вещества.

Для приготовления буферных растворов использовали следующие реактивы: фосфатно-солевой буфер, pH 7,4, таблетки (кат. № B-60201, НПЦ «Эко-Сервис», Россия); Твин 20 (кат. № P7949, Sigma-Aldrich, США); натрия азид (кат. № A1430.0100, Panreac Applichem, Испания); глицин (кат. № 1.00590.1000, Merck, Германия). В работе использовали буферный раствор PBS-T (10 mM фосфатно-солевой буферный раствор; 0,05% Твин 20, pH 7,2–7,6); 5% раствор NC для блокирования биосенсоров (PBS-T; 0,05% натрия азид; 5% NC); буферный раствор для разведения образцов и хранения биосенсоров (PBS-T; 0,05% натрия азид); буферный раствор для регенерации биосенсоров (20 mM глицин-HCl, pH 2,0).

При валидации методики использовали 96-луночные несорбирующие планшеты черного цвета (кат. № 655209, Greiner Bio-One GmbH, Австрия); стрептавидиновые биосенсоры для интерферометра Octet «High Precision Streptavidin (SAX)» (кат. № 18-5117, Fortebio, США).

Метод биослойной интерферометрии

Подготовка биосенсоров. Биотинилированный ромиплостим в концентрации 10 мкг/мл сорбировали на стрептавидиновых биосенсорах при комнатной температуре в течение 2 ч. Свободные сайты связывания биосенсоров блокировали 5% NC и далее проводили 3 цикла регенерации биосенсоров раствором 20 mM глицин-HCl.

Пробоподготовка образцов. Искажающее воздействие компонентов сыворотки крови, отличающихся от оАЛА (например, ревматоидный фактор и растворимые мишени лекарственных препаратов), которое способно приводить к получению ложных результатов, называется «эффект матрицы». Для снижения этого эффекта

исследуемые и контрольные образцы в 20-кратных разведениях (минимальное необходимое разведение, МНР), приготовленных в PBS-T с добавлением 0,05% натрия азиды, инкубировали при 65 °C в течение 20 мин, что, как было установлено в предварительных экспериментах, не влияло на чувствительность метода.

Для определения титра оАЛА из образцов в МНР готовили серии последовательных разведений в 5% NC.

Выполнение скрининг-теста. В лунки 96-луночного несорбирующего планшета черного цвета вносили 240 мкл образцов в МНР после пробоподготовки не менее чем в двух повторях.

Выполнение подтверждающего теста. В лунки планшета вносили 240 мкл образцов в МНР после пробоподготовки не менее чем в четырех повторях. В половину лунок, содержащих каждый анализируемый образец, добавляли ромипlostим до концентрации 20 мкг/мл.

Оценка титра оАЛА. Образцы в объеме 240 мкл (серии последовательных разведений) добавляли в лунки планшета не менее чем в двух повторях.

Детектирование белкового комплексобразования. Образование комплексов ромипlostима и антител к нему регистрировали в режиме реального времени с использованием интерферометра Octet® QKe (Pall Corporation, ForteBio, США). Рабочую температуру поддерживали на уровне 30 °C при скорости перемешивания планшета 1000 rpm. Аналитический сигнал каждого образца представлял собой сдвиг длины волны, измеренный в нм, в конце этапа ассоциации оАЛА с биотинилированным ромипlostимом в течение 17 мин. После каждого этапа ассоциации проводили два цикла регенерации биосенсоров 20 mM глицин-HCl в течение 5 с каждый и последующее уравнивание в 5% NC в течение 50 с.

Статистическая обработка результатов

Основные валидационные характеристики методики определяли в соответствии с рекомендациями G. Shankar с соавт. [5] и D. Jani с соавт. [11].

Оценка нормальности распределения данных в выборках при определении фактора биологической вариабельности ($CPf_{скр}$) и предельного значения незначимого ингибирования ($CP_{пт}$) осуществлялась с использованием статистического теста Д'Агостино – Пирсона в программе GraphPad Prism 8. Остальные расчеты проводились в программе Microsoft Excel 2016.

Обнаружение выбросов в исследуемых данных проводилось с помощью межквартильного

интервала. Коэффициент вариации (%CV) рассчитывался как отношение стандартного отклонения (SD) к среднему значению рассматриваемой величины и выражался в процентах.

Расчет валидационных параметров

Фактор биологической вариабельности для расчета предельного значения скрининг-теста ($CPf_{скр}$) и определения титра оАЛА вычисляли по формуле (1):

$$CPf_{скр} = \frac{10^{95th\ percentile(\log A)}}{A_{mean}}, \quad (1)$$

где 95th percentile ($\log A$) – 95%-й перцентиль десятичного логарифма аналитического сигнала индивидуальных образцов исследуемой выборки; A_{mean} – среднее значение аналитического сигнала индивидуальных образцов исследуемой выборки.

Предельное значение скрининг-теста ($CP_{скр}$) рассчитывали по формуле (2):

$$CP_{скр} = \bar{A}_{NC} \times CPf_{скр}, \quad (2)$$

где $\bar{A}_{NC}$ – среднее значение аналитического сигнала негативного контрольного образца; $CPf_{скр}$ – фактор биологической вариабельности для скрининг-теста и определения титра.

Образцы, значения аналитических сигналов которых превышали предельное значение скрининг-теста, считали условно положительными.

При проведении подтверждающего теста рассчитывали показатель «процент ингибирования» (%) сигнала каждого образца в МНР с добавлением ромипlostима относительно образца в МНР без добавления ромипlostима по формуле (3):

$$\%I = 100 \times \left(1 - \frac{\bar{A}_{CS}}{\bar{A}_B} \right), \quad (3)$$

где $\bar{A}_{CS}$ – среднее значение аналитического сигнала образца с добавлением ромипlostима; $\bar{A}_B$ – среднее значение аналитического сигнала образца без добавления ромипlostима.

Предельное значение незначимого ингибирования ($CP_{пт}$) рассчитывали по формуле (4):

$$CP_{пт} = \%I + 3,09 \times SD_{\%I}, \quad (4)$$

где $\%I$ – среднее значение показателя «процент ингибирования» индивидуальных образцов исследуемой выборки; «3,09» – 0,999 квантиль стандартного нормального распределения; $SD_{\%I}$ – стандартное отклонение показателя «процент ингибирования» образцов исследуемой выборки.

Для снижения вероятности получения ложноположительных результатов взамен рекомендуемого 0,99 квантиля [11] в расчетах использовали 0,999 квантиль стандартного нормального распределения.

Образцы, значение показателя %I которых превышало $CP_{пт}$, считали положительными по наличию оАЛА.

Разведение, при котором аналитический сигнал образца соответствует значению $CP_{скр}$, принимали в качестве титра оАЛА в положительных контрольных образцах.

Оценка прецизионности методики для определения антител к ромиплостиму включала в себя доказательство воспроизводимости и повторяемости результатов.

Прецизионность результатов скрининг-теста оценивали по нормированным коэффициентам (K). Для оценки воспроизводимости нормированные коэффициенты ($K_{воспр}$) рассчитывали по формуле (5):

$$K_{воспр} = \frac{\bar{A}_{PC}}{CP_{скр}}, \quad (5)$$

где $\bar{A}_{PC}$ — среднее значение аналитического сигнала положительного контрольного образца (PC) в опыте; $CP_{скр}$ — предельное значение скрининг-теста.

Аналогичным образом рассчитывали нормированные коэффициенты для оценки повторяемости, но используя значение аналитического сигнала PC отдельного повтора вместо среднего значения сигнала.

Для оценки воспроизводимости и повторяемости подтверждающего теста рассчитывали значения показателя %I по формуле (3), используя средние значения аналитических сигналов и значения аналитических сигналов в отдельных повторах соответственно.

Воспроизводимость результатов определения титра оАЛА оценивали, рассчитывая медиану полученных значений титра оАЛА каждого PC. Максимальное и минимальное допустимые значения титра определяли путем умножения и деления медианного значения на 2,5 (максимальный коэффициент кратности серии разведений для расчета титра).

Нижний предел детекции (НПД) опыта вычисляли по формуле (6):

$$НПД_{опыт} = \frac{C}{\text{Титр}} \times 20, \quad (6)$$

где C — концентрация оАЛА в PC, нг/мл; Титр — рассчитанный в опыте титр оАЛА в PC; «20» — минимальное необходимое разведение.

НПД методики рассчитывали как сумму среднего значения НПД по всем опытам и значения трех стандартных отклонений.

Устойчивость методики к присутствию в образцах лекарственного препарата характеризовали по коэффициенту выявления (%R), который рассчитывали по формуле (7):

$$\%R = 100 \times \frac{\bar{A}_{с\ внесением}}{\bar{A}_{без\ внесения}}, \quad (7)$$

где $\bar{A}_{с\ внесением}$ — среднее значение аналитического сигнала контрольного образца с внесением препарата; $\bar{A}_{без\ внесения}$ — среднее значение аналитического сигнала контрольного образца без внесения препарата.

Стабильность биосенсоров с иммобилизованным ромиплостимом для каждого исследуемого PC оценивали по значениям %R, которые рассчитывали по отношению значений аналитических сигналов, полученных при использовании биосенсоров после хранения и до закладки на хранение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перечень оцененных валидационных характеристик и критерии приемлемости представлены с учетом текущих требований нормативной документации³.

Определение фактора биологической вариабельности для расчета предельного значения скрининг-теста и определения титра оАЛА

Для определения фактора биологической вариабельности ($CPf_{скр}$) были проанализированы 48 образцов сыворотки крови человека. Образцы анализировали два исследователя, каждый из которых провел три независимых опыта в разные дни. Один опыт включал в себя скрининг-тест всех исследуемых образцов.

Результаты статистического теста Д'Агостино–Пирсона показали, что распределение значений аналитического сигнала образцов исследуемой выборки не соответствует нормальному. Значения аналитических сигналов были преобразованы в соответствующие значения десятичного логарифма, при этом два образца были исключены из расчета $CPf_{скр}$ как выбросы. Среднее значение $CPf_{скр}$ составило 1,481.

³ Immunogenicity testing of therapeutic protein products — developing and validating assays for anti-drug antibody detection. Guidance for industry. Center for Biologics Evaluation and Research, FDA; 2019.
ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.

Определение предельного значения незначимого ингибирования для подтверждающего теста

Вычисленное значение незначимого ингибирования аналитического сигнала, выраженное в процентах, разделяющее исследуемые образцы на подтвержденные или неподтвержденные по наличию оАЛА, называют предельным значением незначимого ингибирования для подтверждающего теста ($CP_{пт}$) [12].

Оценка $CP_{пт}$ проводилась на той же выборке и при тех же условиях, что и оценка $CP_{скр}$. Значения показателя %I аналитического сигнала образцов исследуемой выборки характеризовались нормальным распределением; выбросы не были выявлены. Значение $CP_{пт}$ подтверждающего теста составило 34,2%.

Оценка прецизионности результатов методики

Для оценки воспроизводимости методики были проанализированы образцы РС и НС двумя исследователями в разные дни (табл. S1, опубликована на сайте журнала⁴). Для оценки повторяемости каждый контрольный образец был проанализирован в 6 повторах одним исследователем в одном опыте (табл. S2, опубликована на сайте журнала⁵).

При оценке результатов руководствовались следующими критериями приемлемости:

- коэффициент вариации между значениями нормированного коэффициента (K) при про-

ведении скрининг-теста или между значениями показателя %I при проведении подтверждающего теста должен составлять $\leq 20\%$ при оценке повторяемости и $\leq 25\%$ при оценке воспроизводимости;

- значения титра оАЛА не должны отклоняться от рассчитанного медианного значения более чем в 2,5 раза.

На рисунке 1 приведен пример сенсограммы, полученной при определении титра оАЛА в образце VНРС.

При оценке воспроизводимости и повторяемости коэффициент вариации значений показателя K не превышал 6,7 и 10,5%, а показателя %I – не превышал 3,0 и 7,8% соответственно. Полученные значения титра оАЛА при оценке воспроизводимости отличались от медианного значения не более чем в 2,1 раза (табл. S1, табл. S2).

Результаты оценки прецизионности удовлетворяли установленным критериям приемлемости.

Оценка нижнего предела детекции скрининг-теста

Значение НПД оАЛА к ромиплостиму определяли по данным 6 независимых опытов, выполненных двумя исследователями в разные дни. Образцы НРС анализировали в серии разведений от 1/20 до 1/2000. Несмотря на то что поликлональные кроличьи антитела

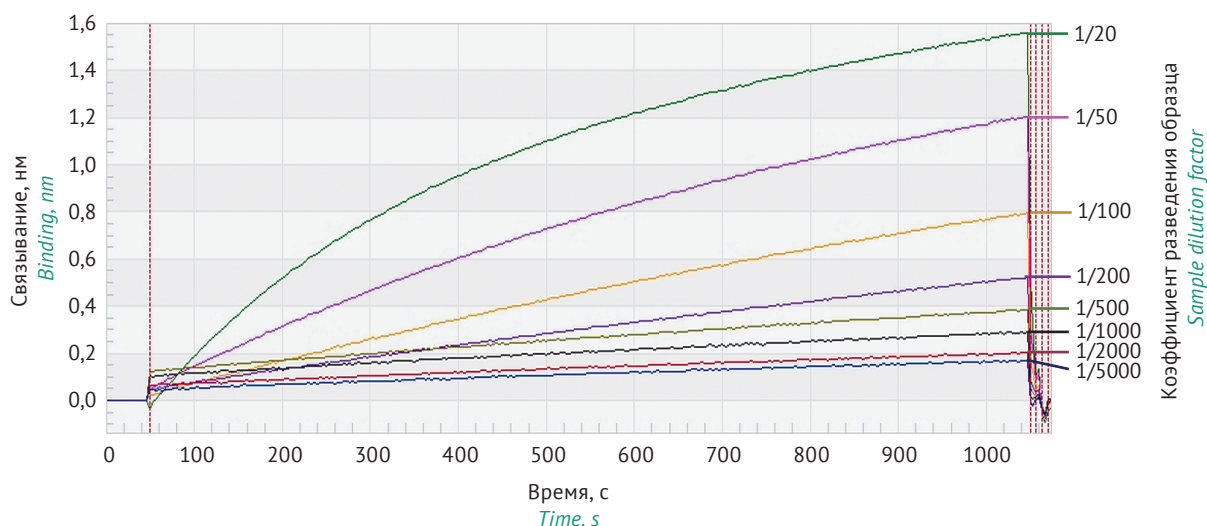


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Типовая сенсограмма взаимодействия поликлональных кроличьих антител к ромиплостиму в разных разведениях исходного образца (50 мкг/мл) с иммобилизованным на стрептавидиновых биосенсорах ромиплостимом.

Fig. 1. A typical sensogram of the interaction of polyclonal rabbit antibodies to romiplostim in different dilutions of the initial sample (50 µg/mL) with romiplostim immobilised on the streptavidin-coated biosensors.

⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s1>

⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s2>

не могут полностью отражать свойства человеческих антител, образующихся в ответ на введение ромиплостима, их использование на этапе разработки позволило оптимизировать условия анализа, повысив его чувствительность [13, 14]. Значение НПД методики по обнаружению поликлональных кроличьих антител к ромиплостиму составило 622 нг/мл.

Оценка эффекта высокой дозы при проведении скрининг-теста и подтверждающего теста

Эффект высокой дозы — распространенное явление, при котором из-за ограниченного количества иммобилизованного препарата и чрезвычайно высоких концентраций антител в образце происходит снижение образования комплексов антиген/антитело. Эффект высокой дозы способен приводить к получению ложноотрицательных результатов [15].

Для определения эффекта высокой дозы в скрининг-тесте и подтверждающем тесте использовали образцы VHPC и HPC. Предельное значение скрининг-теста в проведенном опыте составило 0,1552. Более высокой концентрации антител соответствовал более высокий

уровень аналитического сигнала в скрининг-тесте и большее значение показателя %I (табл. S3, опубликована на сайте журнала⁶). Эффект высокой дозы при анализе образцов VHPC и HPC отсутствовал.

Вероятность возникновения эффекта высокой дозы крайне мала при анализе образцов, содержащих нативные человеческие антитела к ромиплостиму, которые характеризуются более низкой аффинностью по сравнению с антителами, используемыми в положительных контрольных образцах [13]. Для снижения вероятности получения ложноотрицательных результатов использовали дополнительные разведения образцов, аналитический сигнал которых соответствовал VHPC, при этом сохранялось 5%-ное содержание сыворотки в разведениях образцов.

Эффект матрицы при проведении скрининг-теста и подтверждающего теста

Для оценки эффекта матрицы в индивидуальные образцы сыворотки крови здоровых добровольцев, не получавших ранее лечение ромиплостимом, добавляли поликлональные кроличьи антитела к ромиплостиму до финальной концентрации 800 нг/мл. В качестве

Таблица 1. Оценка эффекта матрицы при проведении скрининг-теста
Table 1. Assessment of the matrix effect during the screening test

Номер образца Sample ID	Без добавления оАЛА Without the addition of binding ADA			С добавлением оАЛА With the addition of binding ADA			
	$\bar{A}_{\text{ИО}}, \text{нм}$ $\bar{A}_{\text{ИО}}, \text{nm}$	%CV	$\bar{A}_{\text{ИО}} \leq \text{CP}_{\text{скр}}$	$\bar{A}_{\text{ЛРС}}, \text{нм}$ $\bar{A}_{\text{ЛРС}}, \text{nm}$	%CV	$\frac{\bar{A}_{\text{ЛРС}}}{\bar{A}_{\text{ИО}}}$	$\frac{\bar{A}_{\text{ЛРС}}}{\bar{A}_{\text{ИО}}} > \text{CPf}_{\text{скр}}$
IS06	0,1463	0,4	Да / Yes	0,2067	0,4	1,413	Нет / No
IS11	0,0933	3,5	Да / Yes	0,1493	0,9	1,600	Да / Yes
IS17	0,0777	2,0	Да / Yes	0,1326	7,6	1,706	Да / Yes
IS28	0,0605	0,2	Да / Yes	0,1251	0,6	2,067	Да / Yes
IS29	0,0877	4,3	Да / Yes	0,1443	0,3	1,646	Да / Yes
IS31	0,1826	0,6	Нет / No	0,2232	0,3	1,222	Нет / No
IS37	0,0681	6,3	Да / Yes	0,1398	2,4	2,054	Да / Yes
IS44	0,0529	0,4	Да / Yes	0,1167	1,0	2,208	Да / Yes
IS47	0,0954	13,7	Да / Yes	0,1719	1,3	1,803	Да / Yes
IS48	0,1254	4,1	Да / Yes	0,1871	1,2	1,492	Да / Yes

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

Примечание. оАЛА — общее антилекарственное антитело; %CV — коэффициент вариации; $\text{CP}_{\text{скр}}$ — предельное значение скрининг-теста (0,158); $\text{CPf}_{\text{скр}}$ — фактор биологической вариабельности; $\bar{A}_{\text{ИО}}$ — усредненное значение сигнала исследуемого образца без добавления оАЛА; $\bar{A}_{\text{ЛРС}}$ — усредненное значение сигнала исследуемого образца с добавлением оАЛА до 800 нг/мл.
Note. ADA, anti-drug antibodies; %CV, coefficient of variation; $\text{CP}_{\text{скр}}$, cutoff value of the screening test (0.158); $\text{CPf}_{\text{скр}}$, biological variability factor; $\bar{A}_{\text{ИО}}$, mean value of the signal of the test sample without addition of ADA; $\bar{A}_{\text{ЛРС}}$, mean value of the signal of the test sample with addition of ADA up to 800 ng/mL.

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s3>

образцов сравнения служили образцы сыворотки крови без добавления антител.

По данным скрининг-теста аналитические сигналы 9 из 10 образцов без добавления антител были ниже предельного значения скрининг-теста (0,158); один образец IS31 показал ложноположительный результат (табл. 1). Аналитические сигналы всех образцов, содержащих антитела к ромиплостиму, включая IS31, были охарактеризованы как условно положительные. При этом аналитические сигналы 8 из 10 образцов, содержащих оАЛА, превышали таковые образцов сравнения более чем в 1,481 раза (табл. 1).

Результаты оценки эффекта матрицы при проведении подтверждающего теста приведены в таблице 2. Для 8 из 10 проанализированных образцов значения показателя %I превышали значения $CP_{\text{пт}}$.

Аналитический сигнал образцов IS06 и IS31 после добавления в них антител к ромиплостиму вырос менее чем в 1,481 раза. С одной стороны, в скрининг-тесте было установлено, что аналитические сигналы данных образцов без добавления антител были несколько повышены относительно среднего значения сигнала по выборке (табл. 1). С другой стороны, значения показателя %I образцов IS06 и IS31 были ниже значения $CP_{\text{пт}}$.

(табл. 2). Эти наблюдения могут быть обусловлены неспецифическим связыванием с биосенсором компонентов сыворотки крови, препятствующих связыванию антител. Предположительно, при более высоких (>800 нг/мл) концентрациях антител к ромиплостиму в образцах вероятность получения ложноположительных результатов в подтверждающем тесте будет минимальна.

Оценка специфичности методики при проведении скрининг-теста и подтверждающего теста

При проведении скрининг-теста усредненные значения аналитических сигналов контрольных образцов, содержащих 10 мкг/мл антител к омализумабу или 20 мкг/мл человеческих антител класса G, составили 0,1070 и 0,1029 соответственно и были ниже предельного значения скрининг-теста (0,166). Ложноположительных результатов не наблюдалось.

При проведении подтверждающего теста добавление в образцы ромиплостима в качестве антигена должно приводить к ингибированию сигнала связывания специфических антител, не оказывая влияния на антитела иной специфичности⁷. В таблице S4 (опубликована на сайте журнала⁸) показаны результаты

Таблица 2. Оценка эффекта матрицы при проведении подтверждающего теста образцов сыворотки крови с добавлением оАЛА
Table 2. Assessment of the matrix effect in confirmatory test while analysing blood serum samples with the addition of binding ADA

Номер образца Sample ID	$\bar{A}_B$, нМ $\bar{A}_B$, nm	%CV	$\bar{A}_{CS}$, нМ $\bar{A}_{CS}$, nm	%CV	%I	%I > $CP_{\text{пт}}$
IS04	0,1978	5,2	0,0969	9,7	51,0	Да / Yes
IS05	0,2545	7,3	0,1317	10,8	48,3	Да / Yes
IS06	0,2067	0,4	0,1425	4,1	31,1	Нет / No
IS11	0,1493	0,9	0,0800	0,4	46,4	Да / Yes
IS17	0,1326	7,6	0,0708	0,1	46,6	Да / Yes
IS28	0,1251	0,6	0,0596	4,6	52,4	Да / Yes
IS29	0,1443	0,3	0,0774	1,6	46,4	Да / Yes
IS31	0,2232	0,3	0,1581	8,3	29,2	Нет / No
IS37	0,1398	2,4	0,0801	5,1	42,7	Да / Yes
IS44	0,1167	1,0	0,0643	13,1	44,9	Да / Yes

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

Примечание. оАЛА — общее антилекарственное антитело; $\bar{A}_B$ — среднее значение аналитического сигнала индивидуального образца сыворотки крови без добавления ромиплостима; $\bar{A}_{CS}$ — среднее значение аналитического сигнала индивидуального образца сыворотки крови с добавлением ромиплостима; %CV — коэффициент вариации; %I — показатель «процент ингибирования» сигнала образца с добавлением ромиплостима; $CP_{\text{пт}}$ — предельное значение незначимого ингибирования.
Note. ADA, anti-drug antibodies; $\bar{A}_B$, mean value of the analytical signal of an individual blood serum sample without addition of romiplostim; $\bar{A}_{CS}$, mean value of the analytical signal of an individual blood serum sample with addition of romiplostim; %CV, coefficient of variation; %I, percentage of signal inhibition of a sample with addition of romiplostim; $CP_{\text{пт}}$, cutoff value of not significant inhibition.

⁷ Immunogenicity testing of therapeutic protein products — developing and validating assays for anti-drug antibody detection. Guidance for industry. Center for Biologics Evaluation and Research. FDA; 2019.

⁸ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s4>

анализа контрольных образцов, содержащих разные концентрации антител к ромиплостиму, а также ромиплостим или ранибизумаб. В качестве сравнения анализировали образцы, не содержавшие антигенов.

В отличие от ромиплостима, добавление ранибизумаба в качестве неспецифического антигена значимо не ингибировало связывание антител с ромиплостимом. Таким образом, неспецифическое ингибирование аналитического сигнала при проведении подтверждающего теста отсутствовало.

Оценка устойчивости методики к присутствию в образцах лекарственного препарата и его мишени

Мишенью ромиплостима является рецептор тромбопоэтина — трансмембранного белка, расположенного на поверхности тромбоцитов и мегакариоцитов [16]. За исключением случаев контаминации образцов клетками крови при неадекватной пробоподготовке, присутствие рецептора тромбопоэтина в образцах сыворотки крови не предполагается. Следовательно, вероятность возникновения ложноположительных результатов крайне низкая и оценивать влияние белка-мишени на результаты анализа не требуется.

Лекарственный препарат в свободной форме или в форме иммунных комплексов с оАЛА может присутствовать в исследуемых образцах. Поэтому важно оценить устойчивость методики определения оАЛА к ромиплостиму к присутствию последнего, для чего анализировали контрольные образцы, содержавшие 0,8, 2, 10 мкг/мл специфических антител и 1 нг/мл ромиплостима (табл. S5, опубликована на сайте журнала⁹).

По данным J. Qi с соавт. [17] при ежедневном введении ромиплостима в течение 2 нед. максимальная концентрация препарата в сыворотке крови пациентов с ИТП составила 52 и 105 пг/мл при применении препарата в дозе 1 мкг/кг и 3 мкг/кг ромиплостима соответственно [17]. Следовательно, концентрация 1 нг/мл в целом превышает предполагаемый диапазон концентраций ромиплостима в образцах сыворотки крови пациентов, получающих лечение ромиплостимом, и соответствует требованиям к устойчивости методики определения оАЛА в присутствии лекарственного препарата в образцах¹⁰.

Исследования показали, что при анализе образцов, содержащих 1 нг/мл ромиплостима, снижение регистрируемого сигнала отсутствовало.

Оценка устойчивости результатов скрининг-теста и подтверждающего теста к замене компонентов аналитической системы

Для оценки устойчивости результатов скрининг-теста и подтверждающего теста к замене компонентов аналитической системы образцы РС анализировали с использованием биосенсоров, сорбированных биотинилированным ромиплостимом, приготовленным из оригинального или биоаналогичного препарата. В подтверждающем тесте в исследуемые образцы добавляли оригинальный препарат ромиплостима в качестве специфического антигена. Результаты данного анализа сравнивали с результатами анализа образцов, содержащих биоаналогичный препарат.

Экспериментально подтверждена сопоставимость уровней аналитического сигнала независимо от вида используемого препарата, что свидетельствует о возможности применения методики для оценки клинических образцов, содержащих оАЛА, выработанные в ответ на введение как оригинального, так и биоаналогичного препаратов (табл. S6, опубликована на сайте журнала¹¹).

Оценка стабильности иммобилизованного на биосенсорах ромиплостима после хранения и регенераций

Стабильность биосенсоров с иммобилизованным биотинилированным ромиплостимом после длительного хранения и регенерации оценивали путем определения оАЛА в образцах с использованием биосенсоров, которые хранили в течение 2 нед. при температуре 5 ± 3 °C и подвергали не менее 20 циклам регенерации. Результаты оценки стабильности приведены в таблице 3.

В качестве критерия приемлемости использовался диапазон значений коэффициента выявления %R — от 80 до 120%. Согласно полученным данным иммобилизованный на биосенсорах биотинилированный ромиплостим был стабилен после хранения в течение 2 нед. при температуре 5 ± 3 °C и не менее 20 циклов регенерации.

⁹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s5>

¹⁰ Immunogenicity testing of therapeutic protein products — developing and validating assays for anti-drug antibody detection. Guidance for industry. Center for Biologics Evaluation and Research, FDA; 2019.

¹¹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s6>

Таблица 3. Оценка стабильности иммобилизованного на биосенсорах ромиплостима после хранения и регенераций
Table 3. Stability assessment of romiplostim immobilized on the biosensors after storage and regenerations

Образец <i>Sample</i>	A1, нм <i>A1, nm</i>	A2, нм <i>A2, nm</i>	$\bar{A}$, нм <i>$\bar{A}$, nm</i>	SD	%CV	%R
Биосенсоры до хранения / <i>Biosensors before storage</i>						
HPC	0,8098	0,7033	0,757	0,0753	10,0	–
MPC	0,2662	0,2623	0,264	0,0028	1,0	–
LPC	0,1655	0,1861	0,176	0,0146	8,3	–
Биосенсоры после хранения ^a / <i>Biosensors after storage^a</i>						
HPC	0,6379	0,6610	0,6495	0,0163	2,5	86
MPC	0,2683	0,2674	0,2679	0,0006	0,2	101
LPC	0,1742	0,1777	0,1760	0,0025	1,4	100

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

Примечание. A1 и A2 – значения аналитического сигнала в двух повторах; $\bar{A}$ – среднее значение сигнала образца; SD – стандартное отклонение; %CV – коэффициент вариации; %R – коэффициент выявления; HPC, MPC, LPC – высокий, средний и низкий положительный контрольный образец соответственно; «–» – не применимо.

^a Биосенсоры после хранения в течение 2 нед. при 5±3 °C и не менее 20 циклов регенераций.

Note. A1 and A2, analytical signal values of two replicates; $\bar{A}$, mean value of the analytical signal; SD, standard deviation; %CV, coefficient of variation; %R, detection coefficient; HPC, MPC, and LPC, high, medium and low positive control sample, respectively; –, not applicable.

^a Biosensors after storage for 2 weeks at 5±3 °C and at least 20 regeneration cycles.

ВЫВОДЫ

1. Результаты проведенной валидации подтверждают пригодность разработанной методики для получения достоверных и воспроизводимых результатов при определении оАЛА к ромиплостиму в образцах сыворотки крови человека.
2. Доказана применимость методики для оценки связывающих антител к ромиплостиму в образцах сыворотки крови человека, образующихся в ответ на введение как оригинального, так и биоаналогичного препаратов.
3. Метод биослойной интерферометрии может применяться для определения оАЛА, в том случае, если компоненты сыворотки крови оказывают значительное влияние на результаты анализа.
4. Преимущество разработанной методики заключается в возможности определения оАЛА в образцах, содержащих 1 нг/мл ромиплостима.
5. Анализ 96-луночного планшета занимает 4 ч, включая этап пробоподготовки образцов.
6. Регенерация биосенсоров позволяет выполнить не менее 20 независимых измерений связывания оАЛА с ромиплостимом без потери качества данных.

Литература/References

1. Меликян АЛ, Егорова ЕК, Пустовая ЕИ, Колошейнова ТИ, Володичева ЕМ, Капорская ТС и др. Промежуточные результаты эпидемиологического исследования идиопатической тромбоцитопенической пурпуры у взрослых в Российской Федерации. *Гематология и трансфузиология*. 2019;64(4):436–46. Melikyan AL, Egorova EK, Pustovaya EI, Kolosheynova TI, Volodicheva EM, Kaporskaya TS, et al. Interim results of epidemiological study of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults in the Russian Federation: intermediate results. *Hematology and Transfusiology*. 2019;64(4):436–46 (In Russ.).
<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-4-436-446>
2. Neunert C, Terrell DR, Arnold DM, Buchanan G, Cines DB, Cooper N, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. *Blood Adv*. 2019;3(23):3829–66.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000966>
3. Barger TE, Boshier A, Jawa V, Kim J, Mytych DT, Park J, et al. Assessment of romiplostim immunogenicity in adult patients in clinical trials and in a global registry. *Blood*. 2018;132 (Supplement 1):2427.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-113484>
4. Swanson SJ. What are clinically significant anti-drug antibodies and why is it important to identify them. *Front Immunol*. 2024;15:1401178.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1401178>
5. Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48(5):1267–81.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.09.020>
6. Hagman C, Chasseigne G, Nelson R, Anlauff F, Kagan M, Goldfine AB, et al. Immunogenicity assessment strategy

- for a chemically modified therapeutic protein in clinical development. *Front Immunol.* 2024;15:1438251 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1438251>
7. Shibata H, Nishimura K, Miyama C, Tada M, Suzuki T, Saito Y, et al. Comparison of different immunoassay methods to detect human anti-drug antibody using the WHO erythropoietin antibody reference panel for analytes. *J Immunol Methods.* 2018;452:73–7. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.09.009>
 8. Li J, Schantz A, Schwegler M, Shankar G. Detection of low-affinity anti-drug antibodies and improved drug tolerance in immunogenicity testing by Octet® biolayer interferometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;54(2):286–94. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.08.022>
 9. Jug A, Bratković T, Ilaš J. Biolayer interferometry and its applications in drug discovery and development. *Trends Anal Chem.* 2024;176:117741. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117741>
 10. Wadhwa M, Knezevic I, Kang H-N, Thorpe R. Immunogenicity assessment of biopharmaceutical products: An overview of assays and their utility. *Biologicals.* 2015;43(5):298–306. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.06.004>
 11. Jani D, Marsden R, Mikulskis A, Gleason C, Klem T, Fiorotti CK, et al. Recommendations for the development and validation of confirmatory anti-drug antibody assays. *Bioanalysis.* 2015;7(13):1619–31. <https://doi.org/10.4155/bio.15.96>
 12. Smith HW, Moxness M, Marsden R. Summary of confirmation cut point discussions. *AAPS J.* 2011;13(2):227–9. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9263-z>
 13. Gunn GR, Sealey DC, Jamali F, Meibohm B, Ghosh S, Shankar G. From the bench to clinical practice: understanding the challenges and uncertainties in immunogenicity testing for biopharmaceuticals. *Clin Exp Immunol.* 2016;184(2):137–46. <https://doi.org/10.1111/cei.12742>
 14. Tada M, Suzuki T, Ishii-Watabe A. Development and characterization of an anti-rituximab monoclonal antibody panel. *MAbs.* 2018;10(3):370–9. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1424610>
 15. Namburi RP, Kancherla V, Ponnala AR. High-dose hook effect. *J Dr NTR Univ Health Sci.* 2014;3(1):5–7. <https://doi.org/10.4103/2277-8632.128412>
 16. Varghese LN, Defour J-P, Pecquet C, Constantinescu SN. The Thrombopoietin receptor: structural basis of traffic and activation by ligand, mutations, agonists, and mutated calreticulin. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:59. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00059>
 17. Qi J, Zheng L, Hu B, Zhou H, He Q, Liu H, et al. Pharmacokinetics, safety, and pharmacodynamics of romiplostim in chinese subjects with immune thrombocytopenia: a phase I/II trial. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2022;11(3):379–87. <https://doi.org/10.1002/cpdd.1059>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликованы таблицы S1–S6.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s1>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s2>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s3>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s4>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s5>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s6>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Агафонова** — написание текста рукописи, формулирование выводов, работа с источниками литературы; **М.В. Жилыева** — планирование исследования, выполнение экспериментальных работ, интерпретация результатов исследования; **И.В. Лягоскин** — постановка цели, руководство исследованием, работа с текстом и критический пересмотр его содержания; **А.А. Казаров** — статистическая обработка данных на всех этапах валидации методики; **А.Е. Лисова** — доработка текста рукописи; **Р.Р. Шукуров** — критическая оценка содержания текста, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено на заседании Межвузовского комитета по этике (Протокол № 2 от 20.02.2020) при АНО «Организационно-техническое обеспечение «МКЭ».

Благодарности. Авторы выражают благодарность В.М. Симонову за ценные консультации по проводимой работе, а также всему коллективу АО «ГЕНЕРИУМ» за предоставление оборудования, материалов и содействие при проведении исследования.

Additional information. Tables S1–S6 are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.*

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s1>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s2>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s3>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s4>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s5>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-639-table-s6>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Agafonova** wrote the manuscript, formulated conclusions, and worked with literature sources. **M.V. Zhilyaeva** developed the study plan, performed experimental work, and interpreted the results of the study. **I.V. Lyagoskin** formulated the goal, supervised the study, worked with the text and critically revised its content. **A.A. Kazarov** performed statistical processing of data at all stages of method validation. **A.E. Lisova** finalised the manuscript. **R.R. Shukurov** critically evaluated the content of the text, and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was approved at a meeting of the Interuniversity Ethics Committee (Protocol No. 2 of 20 February 2020) at the ANO Organisational and Technical Support of the IEC.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to V.M. Simonov for valuable consultations on the work carried out, as well as to the entire staff of GENERIUM JSC for providing equipment and materials as well as assistance in conducting the research.

Об авторах / Authors

Агафонова Алена Алексеевна / Alena A. Agafonova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-9163-7991>

Жиляева Мария Владимировна / Maria V. Zhilyaeva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9880-1724>

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

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

Казаров Александр Александрович / Alexander A. Kazarov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0682-6113>

Лисова Алена Евгеньевна / Alena E. Lisova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-1232-5660>

Шукуров Рахим Рахманкулович, канд. биол. наук / **Rakhim R. Shukurov**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6532-7835>

Поступила 26.12.2024

После доработки 24.05.2025

Принята к публикации 06.06.2025

Online first 06.08.2025

Received 26 December 2024

Revised 24 May 2025

Accepted 6 June 2025

Online first 6 August 2025