

Оптимизация способов математической обработки калибровочных кривых при оценке молекулярной массы биологических лекарственных средств методом электрофореза в полиакриламидном геле с SDS

В. А. Томилин, Н. Л. Иванютина, Е. В. Эльберт, Р. А. Волкова

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

Поступила 30.06.2017 г. Принята к публикации 04.07.2017 г.

При испытании биологических лекарственных средств по показателям «Подлинность», «Чистота», «Молекулярная масса» проводят сравнительную оценку исследуемого и стандартного образцов различными физико-химическими методами, в том числе методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях. Для оценки молекулярной массы компонентов стандартного и исследуемого образцов необходимо построение калибровочного графика с использованием белков-маркеров. Проведено 4 эксперимента по электрофоретическому разделению на одном геле наиболее часто используемых наборов маркеров молекулярных масс различных производителей (Amersham™ LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Am), SDS PAGE Molecular Weight Standards, low range (BR), Unstained Protein Molecular Weight Marker (Th), BenchMark™ Protein Ladder (BM), Mark12™ Unstained Standard (M12) (общее количество белков — 45). Работа выполнена с целью оптимизации способов математической обработки калибровочных кривых для указанных наборов и оценки возможности их взаимозаменяемости. Электрофорез в ПААГ с SDS проводили в восстанавливающих условиях с использованием трис-глициновых заливных гелей. Для сравнения рассчитываемых (M) и номинальных (M_0) (указанных в инструкции по применению набора маркеров) значений молекулярной массы (ММ) белков-маркеров нами использовано отклонение ММ в пересчете на единицу молекулярной массы (далее — относительное отклонение). Оценка среднего относительного отклонения молекулярной массы маркеров наборов диапазона ММ 10–100 кДа (наборы Am, BR, Th) при использовании уравнений линейной регрессии показала значения около 10 % (от 8,3 до 12,0 %). Для наборов расширенного диапазона ММ 10–220 кДа (наборы BM, M12) среднее относительное отклонение (16,5–20,3 %) было практически вдвое больше. С целью оптимизации математической обработки для расчета калибровочной зависимости мы применили полиномиальное уравнение регрессии третьей степени. Это позволило снизить относительное отклонение ММ до 2,3–3,5 % при использовании наборов диапазона 10–100 кДа и до 3,7–4,0 % при использовании наборов расширенного диапазона, что важно при оценке сопоставимости различных продуктов.

Ключевые слова: электрофорез в полиакриламидном геле с SDS; молекулярная масса; калибровочный график; линейная регрессия; полином.

Библиографическое описание: Томилин ВА, Иванютина НЛ, Эльберт ЕВ, Волкова РА. Оптимизация способов математической обработки калибровочных кривых при оценке молекулярной массы биологических лекарственных средств методом электрофореза в полиакриламидном геле с SDS. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(3): 165–172.

При испытании биотехнологических лекарственных средств по показателям «Подлинность», «Чистота», «Молекулярная масса» проводят сравнительную оценку испытуемого и стандартного образцов различными физико-химическими методами, в том числе методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях, который включен в ГФ XIII (ОФС.1.2.1.0023.15) [1]. ОФС «Электрофорез в полиакриламидном геле» допускает выбор условий электрофореза и используемые реагенты в зависимости от решаемых задач без определения критерия для их выбора. Допускается использование гелей различного состава, различных белков-маркеров молекулярных масс (ММ), буферных и окрашивающих растворов, возможны варианты обработки образцов и другие различия.

Анализ нормативных документов на различные лекарственные препараты показал, что метод электрофоре-

за в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия широко используется для контроля качества биотехнологических препаратов. Часть препаратов ранее контролировалась по унифицированной методике [2]. Однако в настоящее время в НД на лекарственные средства приведены конкретные методики, в которых различаются используемые гели (заливные и коммерческие, разного размера и концентрации, в том числе градиентные гели), концентрация и состав буферных и окрашивающих растворов, допускается использование различных наборов маркеров молекулярных масс и др.

Оценка молекулярной массы полипептидов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия основана на том, что миграция белков в присутствии избытка анионного детергента (SDS) зависит, главным образом, от их молекулярной массы [3–5]. Ошибка определения ММ в диапазоне от 12 до 220 кДа, рассчитанная по данным K. Weber и M. Osborn

достигала 10 % [4]. Близкие значения ошибки были получены и в исследовательском центре компании Invitrogen [6] при испытании коммерческих гелей (Novex®/NuPAGE® Bis-Tris, Tris-Glycine и другие) при условии учета всех результатов.

Для оценки молекулярной массы в настоящее время различными производителями выпускается широкий спектр готовых смесей белков-маркеров в разных диапазонах молекулярных масс. Анализ нормативной документации (НД) на биотехнологические лекарственные средства показал, что используются наборы маркеров различных производителей, при этом допускается использование аналогичных наборов без указания критериев признания аналогичности.

Наш опыт применения различных наборов маркеров при проведении электрофореза в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при контроле качества биотехнологических лекарственных средств и при аттестации стандартных образцов соответствующих препаратов показал, что на заливных и готовых коммерческих гелях для маркеров как широкого, так и узкого диапазона ММ коэффициент детерминации линейной зависимости не всегда удовлетворяет требованию $R^2 \geq 0,98$.

Цель настоящей работы — оптимизация математической обработки с целью оценки взаимозаменяемости наиболее широко используемых наборов маркеров молекулярной массы для стандартизации процедуры учета результатов при использовании методики электрофореза в ПААГ с SDS. Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

- оценить возможность оптимизации способов математической обработки получаемых данных;
- провести сравнительную оценку результатов определения ММ белков-маркеров наборов, получивших наиболее широкое распространение.

Материалы и методы

В работе использована система для вертикального электрофореза PROTEAN II xi Cell (16 × 20 см) («BioRad», США) в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия

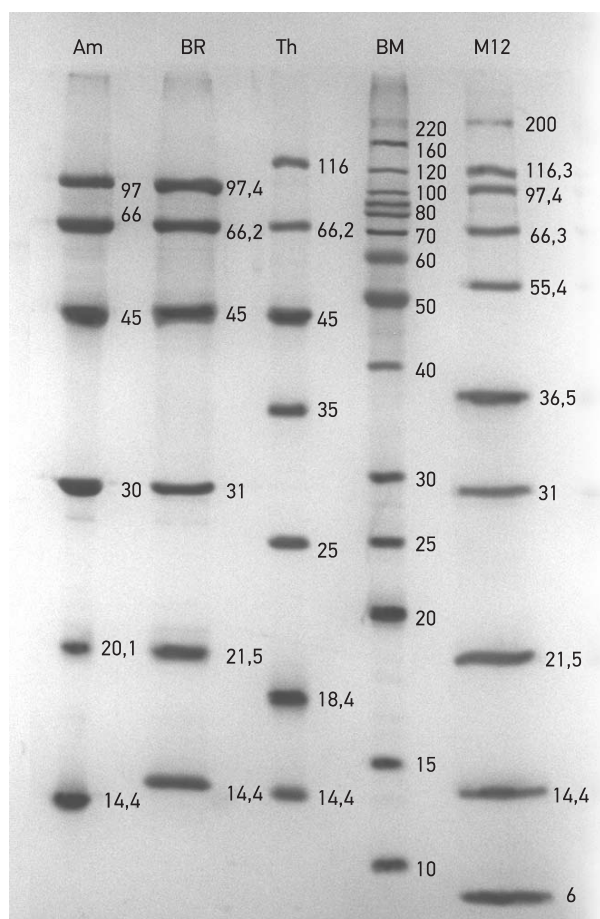


Рис. 1. Электрофореграмма № 1. 12 % Трис-глициновый заливной гель. Образцы наборов Am, Br, Th, BM, M12 были подготовлены и нанесены на гель в соответствии с рекомендацией производителей с пропуском лунок. В свободные лунки вносили буферный раствор для проб. Приведены номинальные значения ММ белков-маркеров (в кДа).

(SDS) в восстанавливающих условиях (в присутствии β-меркаптоэтанола). Приготовление 12 %-ного трис-гли-

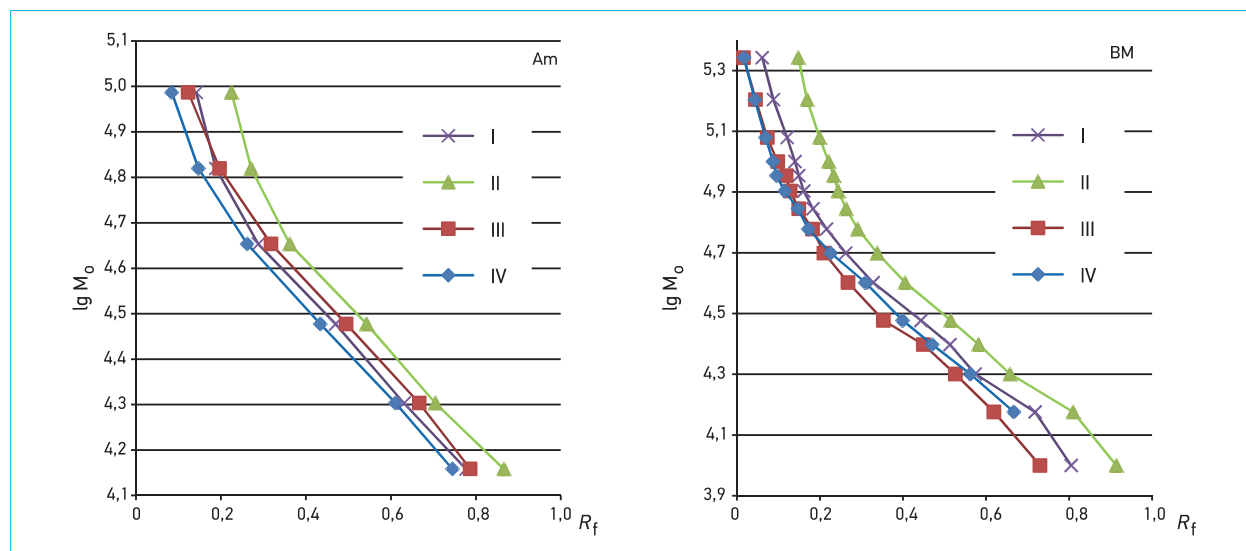


Рис. 2. Калибровочные кривые, построенные по маркерам наборов узкого (Am) и широкого (BM) диапазонов молекулярных масс в четырех испытаниях.

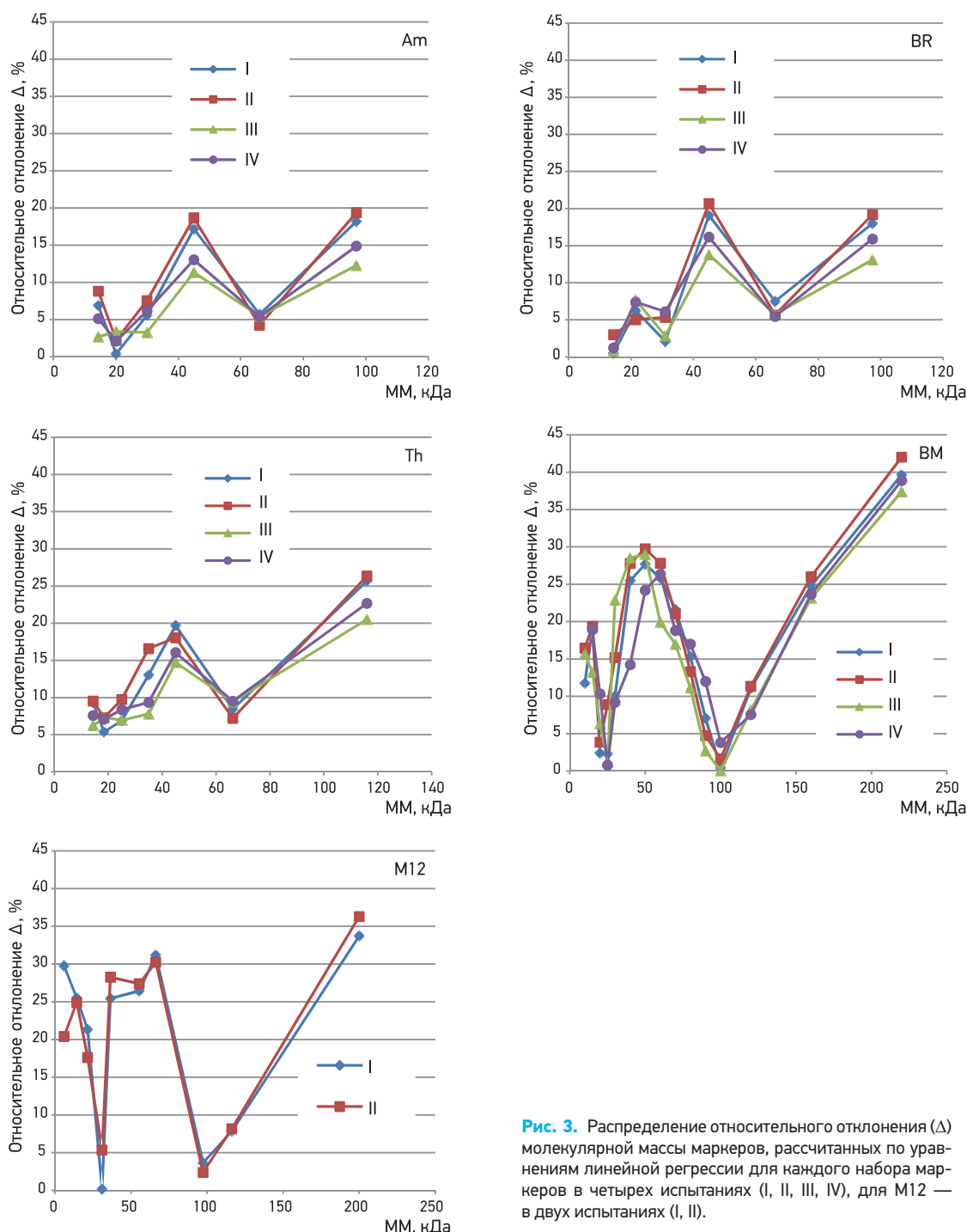


Рис. 3. Распределение относительного отклонения (Δ) молекулярной массы маркеров, рассчитанных по уравнениям линейной регрессии для каждого набора маркеров в четырех испытаниях (I, II, III, IV), для M12 — в двух испытаниях (I, II).

цинового полиакриламидного геля, электрофорез и визуализацию маркеров красителем Кумасси R-250 осуществляли по ОФС.1.2.1.0023.15. [1].

В качестве источников белков с известной молекулярной массой использованы наборы маркеров молекулярной массы Amersham™ LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis («GE Healthcare», (Am), маркеры 14,4; 20,1; 30; 45; 66 и 97 кДа), SDS PAGE Molecular Weight Standards, low range («BioRad», (BR), маркеры 14,4; 21,5; 31; 45; 66,2 и 97,4 кДа), Unstained Protein Molecular Weight Marker («Thermo», (Th), маркеры 14,4; 18,4; 25; 35; 45; 66,2 и

116 кДа), BenchMark™ Protein Ladder («Novex», (BM)*, маркеры 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120; 160 и 220 кДа) Mark12™ Unstained Standard («Novex», (M12)*, маркеры 6; 14,4; 21,5; 31; 36,5; 55,4; 66,3; 97,4; 116,3 и 200 кДа). Подготовка образцов проведена в соответствии с рекомендациями производителей наборов маркеров.

* Наборы маркеров расширенного диапазона (BM и M12) предназначены для работы с готовыми коммерческими гелями, в связи с чем значения относительного отклонения для этих наборов представлены с информационной целью.

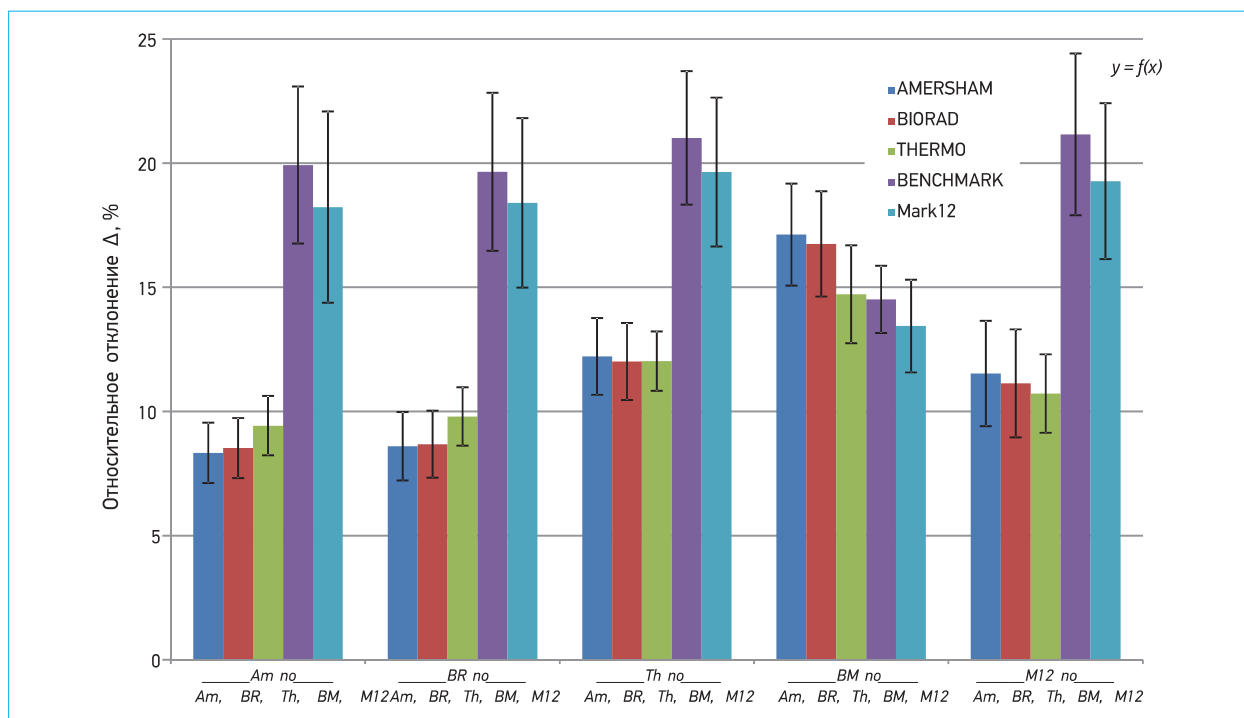


Рис. 4. Сравнение средних значений (по четырем испытаниям, M12 — по двум) относительного отклонения ММ (с обозначением ошибки среднего) наборов маркеров, рассчитанных по линейным уравнениям зависимости наборов Am, Br, Th, BM и M12.

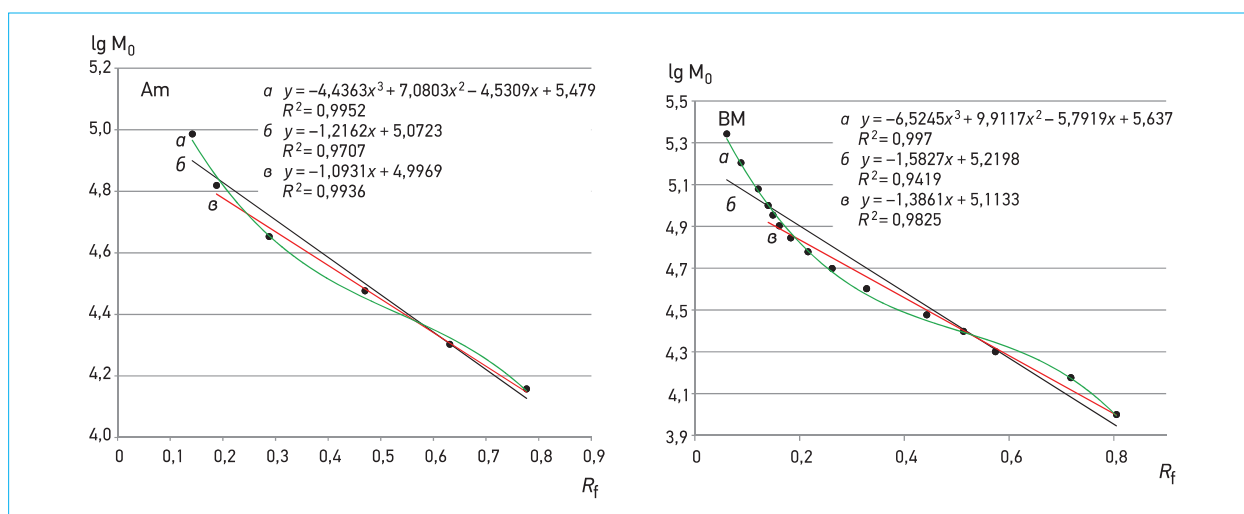


Рис. 5. Аппроксимация линии регрессии с использованием полиномиальной (а) и линейной (б) зависимостей для всех маркеров набора и для маркеров визуально линейного участка наборов узкого (Am) и широкого (BM) диапазонов ММ (в).

Сканирование, первичная обработка гелей и определение относительной подвижности белков R_f (отношение расстояния, пройденного маркером, к расстоянию, пройденному индикатором фронта) проводили в полуавтоматическом режиме в программе Quantity One системы VersaDoc. Построение калибровочных графиков осуществляли в системе координат $(\lg M_0/R_f)$, аппроксимация зависимости, расчеты и статистическая обработка результатов реализовывались с использованием пакета Microsoft Office Excel. Для сравнения рассчитываемых (M) и номинальных (M_0) (указанных в инструкции по применению набора маркеров) значений молекулярной массы белков-маркеров нами использовано абсолютное значение величины отклонения ММ в пересчете на единицу молеку-

лярной массы (далее — относительное отклонение) Δ , который находили по формуле:

$$\Delta(\%) = \frac{|M_0 - M|}{M_0} \cdot 100, \quad (1)$$

Схема эксперимента — проводили электрофоретическое разделение на одном геле всех указанных наборов маркеров (общее количество белков — 45). Эксперимент проводили 4 раза. По значению подвижности белков (R_f) рассчитывали уравнение калибровочной зависимости для каждого набора маркеров. Кажущуюся молекулярную массу (M) и ее относительное отклонение от номинального значения (M_0) рассчитывали для каждого белка по всем

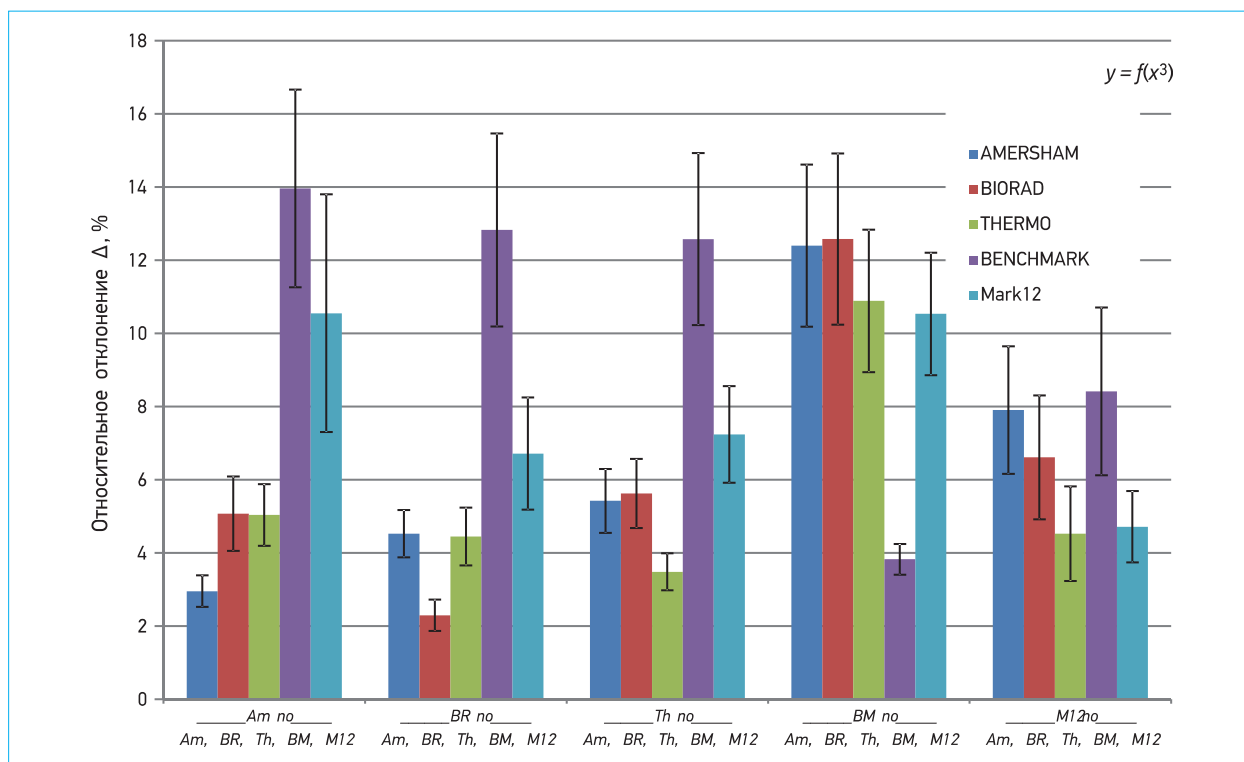


Рис. 6. Сравнение средних значений (по четырем испытаниям) относительного отклонения ММ (с обозначением ошибки среднего) наборов маркеров, рассчитанных по полиномиальным ($y=f(x_i)$) уравнениям зависимости для наборов Am, Br, Th, BM и двум испытаниям набора M12.

калибровкам. Среднее относительное отклонение молекулярной массы маркеров учитывали как для белков конкретного набора, так и для всех белков с номинальной молекулярной массой от 10 до 100 кДа.

Результаты и обсуждение

Наши эксперименты с одновременным разделением пяти наборов маркеров MW диапазонов 10–100 кДа и 10–220 кДа в присутствии SDS в восстанавливающих условиях с использованием трис-глициновых заливных гелей (рис. 1) показали различия в расстоянии миграции белков-компонентов разных наборов с равной/близкой молекулярной массой, например, для полосы, соответствующей молекулярной массе 14,4 кДа.

Калибровочные графики в системе координат ($\lg M_0/R_i$) и линейная аппроксимация калибровочной зависимости каждого из наборов маркеров во всех 4 испытаниях демонстрируют S-образный характер расположения точек калибровочного ряда, менее выраженный для наборов диапазона 10–100 кДа и более явный для расширенного диапазона (рис. 2). Характер распределения значений относительного отклонения ММ, рассчитанных по уравнениям линейной регрессии, в возрастающем ряду молекулярной массы маркеров сохранялся во всех испытаниях для всех наборов (рис. 3).

Расчет среднего относительного отклонения значений молекулярной массы маркеров наборов по всем калибровкам (рис. 4) показал, что оно близко к 10 % для наборов диапазона 10–100 кДа и вдвое больше для наборов расширенного диапазона.

Для снижения ошибки при определении молекулярной массы M. Sadeghi с соавт. [6] было предложено два

подхода: первый — использование только визуально линейных участков калибровок, второй — использование полиномиального уравнения регрессии третьей степени. Графическое сравнение применения этих подходов представлено на рисунке 5. Следует отметить, что для визуально линейных участков статистически оправданное исключение маркера из выборки (значение относительного отклонения более 3σ) возможно лишь для маркера с ММ 220 кДа набора BM.

Возможность аппроксимации калибровочного графика нелинейной функцией предусмотрена также в ГФ XIII (ОФС.1.1.0012.15) [7]. При аппроксимации используют метод наименьших квадратов, суть которого заключается в нахождении коэффициентов, обеспечивающих для исходного уравнения:

$$y_i = a_k x^k + a_{(k-1)} x^{(k-1)} + \dots + a_0, \quad (2)$$

наименьшее значение функции:

$$F(a_k, a_{k-1}, \dots, a_0) = \sum_{i=0}^k (y_i - y)^2. \quad (3)$$

Поиск значений коэффициентов осуществляется путем решения системы из $n = (k + 1)$ уравнений:

$$\begin{cases} \frac{\partial F(a_k)}{\partial a_k} = 0 \\ \frac{\partial F(a_{k-1})}{\partial a_{k-1}} = 0 \dots \\ \frac{\partial F(a_0)}{\partial a_0} = 0 \end{cases} \quad (4)$$

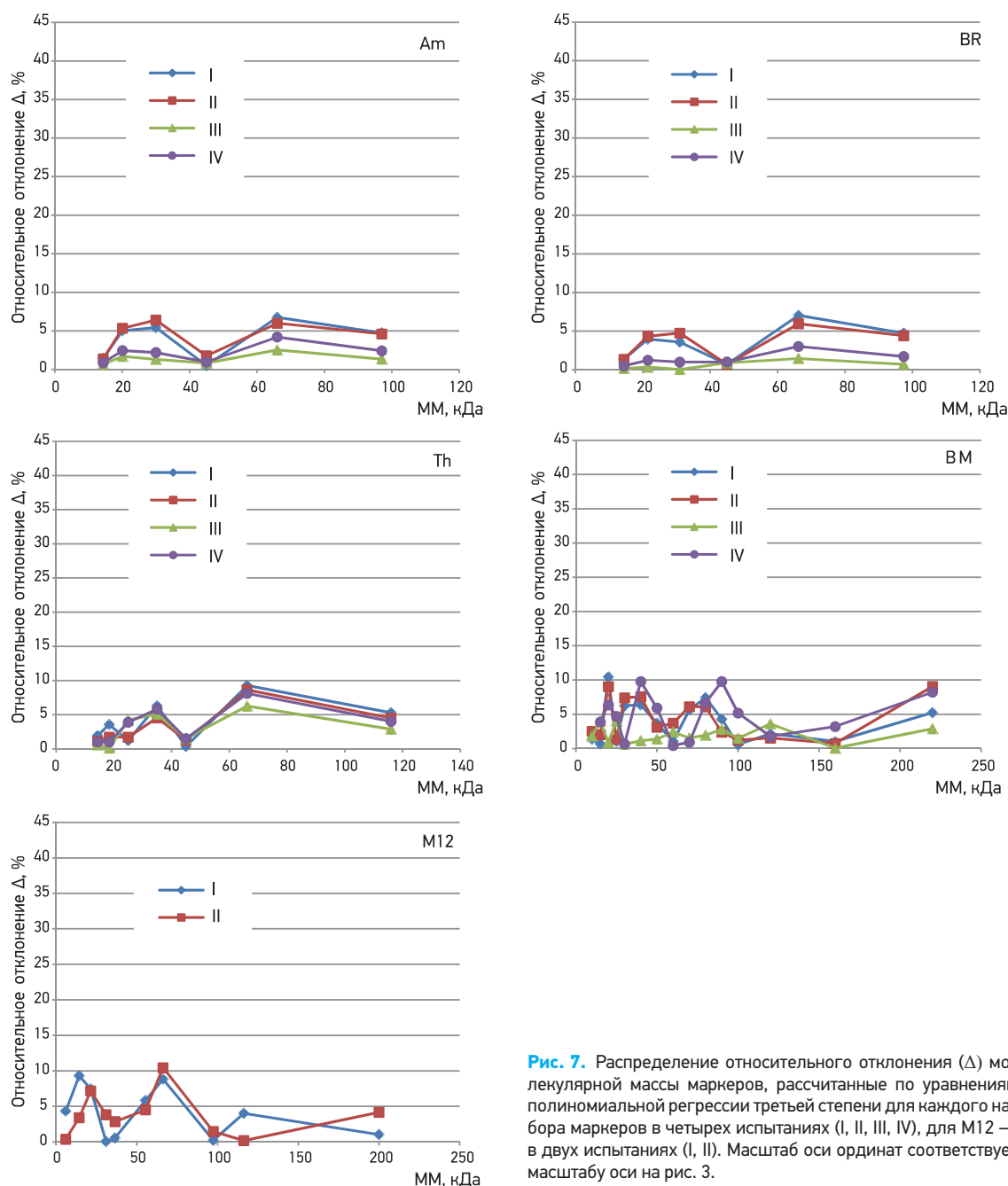


Рис. 7. Распределение относительного отклонения (Δ) молекулярной массы маркеров, рассчитанные по уравнениям полиномиальной регрессии третьей степени для каждого набора маркеров в четырех испытаниях (I, II, III, IV), для M12 — в двух испытаниях (I, II). Масштаб оси ординат соответствует масштабу оси на рис. 3.

Пакет MS Excel предоставляет возможность решения такого рода уравнений при $k \leq 6$, позволяя рассчитывать коэффициенты уравнения и показатель R^2 , характеризующий достоверность аппроксимации:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (M_i - M_{0i})^2}{\sum_i (M_{0i})^2 - \frac{1}{n} \cdot (\sum_i M_{0i})^2}. \quad (5)$$

Оценка результатов применения уравнений калибровочной зависимости на основе полинома третьей степени показала, что минимальные средние значения относительного отклонения ММ маркеров наборов наблюдаются

в случае использования уравнения зависимости, рассчитанного по маркерам этого же ряда (рис. 6).

Использование полиномиального уравнения регрессии третьей степени позволило снизить среднее относительное отклонение молекулярной массы маркеров наборов Am, BR и Th (диапазон 10–100 кДа) с 8,3–12,0 % до 2,3–3,5 %, а для расширенного диапазона (наборы BM и M12) с 16,5–20,3 % до 3,7–4,0 % (рис. 6, табл. 1).

Уменьшение относительного отклонения (Δ) молекулярной массы маркеров, рассчитанное по уравнению полиномиальной регрессии для каждого набора маркеров в четырех испытаниях, представлено на рисунке 7.

Таким образом, применение полиномиального уравнения регрессии третьей степени, благодаря уменьшению

Таблица 1. Среднее значение относительного отклонения молекулярной массы белков-маркеров наборов узкого (Am, BR, Th) и широкого (BM и M12) диапазонов ММ при использовании линейной ($y = f(x)$) и полиномиальной регрессии ($y = f(x^3)$)

Набор маркеров	Среднее относительное отклонение от номинальной массы маркеров (Δ), %			
	$y = f(x)$		$y = f(x^3)$	
	$M \pm m$	n	$M \pm m$	n
Am	8,3 $\pm$ 1,2	24	3,0 $\pm$ 0,4	24
BR	8,7 $\pm$ 1,4	24	2,3 $\pm$ 0,4	24
Th	12,0 $\pm$ 0,6	28	3,5 $\pm$ 0,2	28
BM	16,5 $\pm$ 1,4	59	3,7 $\pm$ 0,4	59
M12	20,3 $\pm$ 2,6	20	4,0 $\pm$ 0,8	20

относительного отклонения, позволяет повысить точность определения молекулярной массы белков, что особенно важно при оценке сопоставимости различных продуктов [8, 9], а также позволяет допустить возможность использования наборов маркеров расширенного диапазона с заливными гелями после валидации методики с учетом вышеизложенного. Замена наборов маркеров ММ, рекомендованных нормативной документацией, на аналогичные требует разработки критериев для признания аналогичности, которые должны учитывать условия проведения испытания и требования к точности результатов анализа.

ВЫВОДЫ

1. Применение полинома третьей степени при аппроксимации калибровочной зависимости снижает относительное отклонение при определении молекулярной массы белков до 4 %: с 8,3–12,5 % до 2,2–3,5 % для диапазона 10–100 кДа, с 16,5–20,3 % до 3,7–4,0 % для расширенного диапазона молекулярной массы 10–220 кДа, что обеспечивает большую точность при сравнении результатов определения молекулярной массы белков, что особенно важно при оценке сопоставимости различных продуктов.

2. Применение полинома третьей степени при аппроксимации калибровочной зависимости допускает возможность использования наборов маркеров BM и M12 с заливными гелями.

3. Замена наборов маркеров ММ, рекомендованных нормативной документацией, на аналогичные должна производиться с учетом условий проведения испытания и требований к точности анализа.

Литература

- ОФС. 1.2.1.0023.15. Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. С. 638–57. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
- Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая. М.: Гриф и К; 2013. С. 80–4.
- Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967; 28(5): 815–20.
- Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1969; 244(16): 4406–12.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680–5.
- Sadeghi M, Hajivandi M, Bogoev R, Amshey J. Molecular weight estimation of proteins by gel electrophoresis revisited. *Focus* 2003; 25: 35–39.
- ОФС. 1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. М.; 2015. С. 222–34. Available from: <http://www.femb.ru/feml>.
- Азеева ЖИ, Волкова РА, Алпатова НА, Солдатов АА, Медуницын НВ, Меркулов ВА. Методические приемы и принципы оценки сопоставимости биотехнологических продуктов, полученных до и после внесения изменений в процесс производства. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2013; (2): 18–21.
- Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013; (2): 28–32.

Об авторах

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

Томили́н Влади́мир Андре́евич. Эксперт 1-ой категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Иваню́тина Ната́лья Леони́довна. Эксперт 2-ой категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Эльбе́рт Елиза́вета Викто́ровна. Главный эксперт лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, канд. биол. наук.

Волко́ва Ра́уза Асха́товна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук.

Адрес для переписки: Томили́н Влади́мир Андре́евич; tomilin@expmed.ru
Волко́ва Ра́уза Асха́товна; volkova@expmed.ru

Optimization of mathematical processing of calibration curves when determining molecular mass of biologicals by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

V. A. Tomilin, N. L. Ivanyutina, E. V. Elbert, R. A. Volkova

Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

Identification and purity testing of biologicals as well as determination of their molecular mass are performed on the basis of comparison of test and reference samples by various physico-chemical methods, including Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing or non-reducing conditions. In order to assess the molecular weight of the test sample and reference sample components a calibration curve is drawn using protein markers. The article describes 4 experiments in which gel electrophoresis was used for separation of the most widely used sets of molecular weight markers produced by various manufacturers (Amersham™ LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Am), SDS PAGE Molecular Weight Standards, low range (BR), Unstained Protein Molecular Weight Marker (Th), Bench-Mark™ Protein Ladder (BM), Mark12™ Unstained Standard (M12) (total number of proteins — 45)). The aim of the study was to optimize mathematical processing of calibration curves generated for the above-mentioned sets of markers and to assess their interchangeability. SDS PAGE was performed under reducing conditions using Tris-Glycine gels. The real calculated (M) and nominal (M_0) values (indicated in the set of markers instructions for use) of the protein markers molecular mass (MM) were compared using the MM deviation expressed in terms of a molecular mass unit (hereinafter — relative deviation). The estimated average MM relative deviation for sets of markers ranging from 10 to 100 kDa (Am, BR, Th sets), which was calculated using linear regression equations, was equal to about 10 % (8.3 – 12.0 %). In the case of the extended MM range of 10 – 220 kDa (BM, M12 sets) the average relative deviation was almost twice as high (16.5 – 20.3 %). A third-order polynomial regression equation was used to optimize mathematical processing methods used during calculation of the calibration function. This made it possible to reduce the MM relative deviation down to 2.3 – 3.5 % when using sets ranging from 10 to 100 kDa, and to 3.7 – 4.0 % when using the extended range sets, which is important for assessing similarity of different products.

Key words: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; molecular mass; calibration curve; linear regression; polynomial.

For citation: Tomilin VA, Ivanyutina NL, Elbert EV, Volkova RA. Problems of standardization of the account of results in assessing the quality of biotechnological drugs by electrophoresis in page with SDS. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(3): 165–172.

References

1. OFS. 1.2.1.0023.15. Polyacrylamide gel electrophoresis. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1. P. 638–57. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
2. Mironov AN, ed. Guidelines for preclinical studies of medicines (immunobiological medicines). Part 2. Moscow: Grif i K; 2013. P. 80–4 (in Russian).
3. Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967; 28(5): 815–20.
4. Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1969; 244(16): 4406–12.
5. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680–5.
6. Sadeghi M, Hajivandi M, Bogoev R, Amshey J. Molecular weight estimation of proteins by gel electrophoresis revisited. *Focus* 2003; 25: 35–39.
7. OFS. 1.1.0012.15. Analytical methods validation. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1. P. 222–34. Available from: <http://www.femb.ru/feml> (in Russian).
8. Avdeeva JI, Volkova RA, Alpatova NA, Soldatov AA, Medunitsyn NV, Merkulov VA. Methodology and principles for comparability assessment of biopharmaceuticals obtained before and after modifications in the manufacturing process. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2013; (2): 18–21 (in Russian).
9. Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeykina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2013; (2): 28–32 (in Russian).

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Tomilin VA. 1st professional category expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Ivanyutina NL. 2nd professional category expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality.

Elbert EV. Chief expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Candidate of Biological Sciences.

Volkova RA. Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality. Doctor of Biological Sciences.

Contact e-mails: Tomilin Vladimir Andreyevich; tomilin@expmed.ru
Volkova Rauza Askhatovna; volkova@expmed.ru