10.15789/1563-0625-DAV-3188

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ПЕМБРОЛИЗУМАБУ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ИНГИБИРОВАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ПЕМБРОЛИЗУМАБА С ЕГО МИШЕНЬЮ PD-1 МЕТОДОМ ИФА

Кудряшова А. М. [1],
Гребенкин Д. Ю. [2],
Самсонов М. Ю. [3],
Филон О. В. [3],
Разживина В. А. [3],
Чернобровкин М. Г. [4],
Борисова О. В. [1]

[1] ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, Москва.
[2] ООО «Экзактэ Лабс», Россия, Москва.
[3] АО "Р-Фарм", Россия, Москва.
[4] ООО «Рисерч лаб», Россия, Москва.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR DETERMINING NEUTRALIZING ANTIBODIES TO PEMBROLIZUMAB IN HUMAN SERUM BASED ON INHIBITION OF BINDING OF PEMBROLIZUMAB TO ITS PD-1 TARGET BY ELISA

Kudryashova A. M [a],
Grebenkin D. Yu. [b],
Samsonov M. Yu. [c],
Filon O. V. [c],
Razzhivina V. A. [c],
Chernobrovkin M. G. [d],
Borisova O. V. [a]

[a] Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera5a, Moscow, Russia.
[b] Exakte Labs LLC, Moscow, Russia.
[c] R-Pharm JSC, Leninsky Prospekt, room 1, Moscow, Russia.
[d] Research Lab LLC, Russia, Moscow.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DAV-3188

Резюме

Гуманизированные моноклональные антитела могут вызывать нежелательный гуморальный иммунный ответ у пациентов - образование антител к терапевтическому белковому препарату. Нейтрализующие антилекарственные антитела являются одним из основных факторов, влияющих на безопасность и эффективность проводимой терапии. При невозможности использовать тесты для определения нейтрализующих антител на основе клеточных культур альтернативой могут служить методы конкурентного связывания лекарственного средства и его лиганда. Пембролизумаб относится к противоопухолевым препаратам широкого спектраи представляет собой гуманизированное IgG4 каппа антитело к рецептору запрограммированной клеточной смерти-1 (PD-1) которое блокирует взаимодействие рецептора с его лигандами PD-L1 и PD-L2. В связи со сложностью проведения анализа применение культурального клеточного теста для пембролизумаба невозможно, так как высок риск получения недостоверных результатов.

Цель. Разработка и валидация методики определения нейтрализующих антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека на основе ингибирования связывания пембролизумаба с его мишенью PD-1.

Материал и методы. В исследование был использован экспериментальный препарат пембролизумаб RPH-075 (Р-Фарм). В качестве положительного контрольного образца на нейтрализующие антитела использовали Anti-Pembrolizumab антитела KRIBIOLISATM Anti-Pembrolizumab (KEYTRUDA®) ELISA, Индия)). Определение антител проводили методом ИФА с применением кислотной диссоциации иммунного комплекса и с использованием техники ACE (Affinity capture elution).

Результаты. Была разработана и валидирована методика выявления нейтрализующих антител к пембролизумабу, основанная на ингибировании пембролизумаба с его мишенью PD-1 в сочетании с техникой ACE. **Разработанная методика была валидирована по показателям: селективность, чувствительность, специфичность, «хук»-эффект, толерантность к присутствию лекарственного препарата, прецизионность.** Благодаря применению подходов предварительной обработки образцов (кислотная диссоциация, техника ACE) для анализа нейтрализующих антител, была достигнута чувствительность 100 нг/мл в присутствии циркулирующего пембролизумаба 40 мкг/мл. Так же в данной работе был обоснован метод расчета предела исключения, чувствительности и селективности на основании ROC-анализа и плавающего предела исключения (PSCP) через средние арифметические значения ОП NC и LPC в каждом индивидуальном аналитическом планшете.

Заключение. Разработанная методика определения нейтрализующих антител к пембролизумабу может быть использована для оценки нежелательной иммуногенности препарата пембролизумаба на стадии клинических испытаний.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

Ключевые слова: ИФА; пембролизумаб; иммуногенность; нейтрализующие антитела; PD-1; клинические исследования; лекарственная толерантность; валидация.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DAV-3188

Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) have the potential to trigger undesired humoral immune responses in the patients and the formation of ADA (anti-drug antibody) to a drug protein.

Neutralizing anti-drug antibodies are one of the main factors affecting the safety and effectiveness of the therapy. If it is impossible to use cell-based tests to determine neutralizing antibodies, competitive ligand binding assay it can be used as an alternative.

Pembrolizumab is a broad-spectrum antitumor drug and is a humanized IgG4 kappa antibody to the programmed cell death receptor-1 (PD-1) that blocks the interaction of the receptor with its ligands PD-L1 and PD-L2. Due to the complex analysis, the use of a cell culture test for pembrolizumab is impossible, as there is a high risk of obtaining unreliable results.

Aim. Development and validation of a method for determining neutralizing antibodies to pembrolizumab in human serum based on inhibition of binding of pembrolizumab to its PD-1 target.

Material and methods. The experimental drug pembrolizumab RPH-075 (R-Pharm) was used in the study. Anti-Pembrolizumab antibodies KRIBIOLISATM Anti-Pembrolizumab (KEYTRUDA®) ELISA, India) were used as a positive control sample for neutralizing antibodies. The determination of antibodies was carried out by the ELISA method with using acid dissociation of the immune complex and the ACE technique (Affinity capture elution).

Results. The ELISA method was validated according to the following characteristic: selectivity, sensitivity, specificity, "hook" effect, drug tolerance, precision. Due to the use of sample pretreatment approaches (acid dissociation, ACE technique) for the analysis of neutralizing antibodies, a sensitivity of 100 ng/ml was achieved in the presence of pembrolizumab 40 μg/ml.

In this paper, a method for calculating the cut-point, sensitivity, and selectivity based on ROC analysis and floating exclusion limit (PSCP) through the average values of OD NC and LPC in each individual analytical cycle was substantiated.

Conclusion. The developed method for determining neutralizing antibodies to pembrolizumab can be used to assess the undesirable immunogenicity of the pembrolizumab at the stage of clinical trials.

Keywords: ELISA, immunogenicity, pembrolizumab, neutralizing antibodies, PD-1, clinical trials, drug tolerance, validation.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DAV-3188

1 Введение

Большой сегмент фармацевтического рынка на сегодняшний день представлен гуманизированными моноклональными антителами (МАТ), которые могут вызывать нежелательный гуморальный иммунный ответ у пациентов - образование антител к терапевтическому белковому препарату. Такие антитела оказывают влияние на фармакокинетику, фармакодинамику, безопасность и эффективность биотерапевтического препарата. Соответственно, тестирование на иммуногенность является неотъемлемой частью процесса разработки лекарственных средств. Как правило, для мониторинга иммуногенности в отношении терапевтических МАТ используется многоуровневый подход, включающий этапы скрининга, подтверждения, титра и нейтрализующей активности. Нейтрализующие антилекарственные антитела (НАТ) являются одним из основных факторов, влияющих на безопасность и эффективность проводимой терапии, и поэтому их оценка имеет особое значение при тестировании на иммуногенность. Методы выявления нейтрализующих антител обычно основаны на их способности блокировать взаимодействие терапевтического препарата с мишенью, и «золотым стандартом» в определении нейтрализующей активности являются тесты на основе клеточных линий, экспрессирующих соответствующую мишень и максимально точно имитирующих механизм действия антител в живом организме [22, 27].

Методы для определения нейтрализующих антител *in vitro*, основанные на ингибировании взаимодействия лекарственного средства и его лиганда, также могут быть применимы, например, когда существуют ограничения в использовании подходящей клеточной линии, интерференции с компонентами анализируемой матрицы, интерференции с препаратами сопутствующей терапии [22, 9]. При невозможности использовать тест-системы на основе клеточных культур альтернативой могут служить методы конкурентного связывания лиганда или другие методы, для которых доказана релевантность в отношении установления нейтрализующей активности [1, 6].

Одной из важных проблем при разработке методик для выявления антител к терапевтическим МАТ, в том числе нейтрализующих, является наличие высоких концентраций циркулирующего лекарственного средства. Данное явление часто наблюдается для препаратов с длительным периодом полувыведения, к которым, в большинстве случаев, относятся и терапевтические антитела. В присутствии циркулирующего лекарственного средства нейтрализующие антитела могут существовать в виде иммунных комплексов и по этой причине не иметь возможности взаимодействовать с компонентами тест-системы, используемой в анализе, что может приводить к ложноотрицательным результатам [12].

В данной работе разработана и валидирована методика определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу, основанная на способности нейтрализующих антител блокировать взаимодействие

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DAV-3188

пембролизумаба с рецептором PD-1, тем самым опосредовано показывая потерю функциональных характеристик препарата.

Использование культурального клеточного теста для данного препарата не возможно в связи со сложностью проведения анализа и, как следствие, с риском получения недостоверных результатов.

Пембролизумаб относится к противоопухолевым препаратам широкого спектра, так называемым регуляторам иммунного синапса или блокаторам иммунных чекпоинтов. Пембролизумаб представляет собой гуманизированное IgG4 каппа антитело к рецептору запрограммированной клеточной смерти-1 (PD-1) которое блокирует взаимодействие между рецептором PD-1 и его лигандами PD-L1 и PD-L2. Терапия препаратами направленных против рецептора PD-1, включая препараты пембролизумаба, может проводиться в течение длительных периодов времени и доходить до 2 лет [17], что в свою очередь может способствовать индукции нейтрализующих антител. Кроме того, в отличие от моноклональных терапевтических антител, направленных на угнетение активации В-клеток, например, против CD19 или CD20, нацеленность пембролизумаба на PD-1, экспрессия которого высока на фолликулярных Т-хелперах, опосредованно увеличивает выработку В-клетками антител в лимфатических узлах, что может прямо или косвенно влиять на гуморальные иммунные реакции, приводящие к индукции антител к данному препарату [4, 10]. Биоаналитические подходы к выявлению связывающих и нейтрализующих антител подробно описаны в научных публикациях [11, 18, 24, 26].

В данной работе для повышения лекарственной толерантности была разработана и валидирована методика, основанная на ингибировании связывания препарата пембролизумаба с его мишенью PD-1 с применением кислотной диссоциации иммунного комплекса и с использованием техники ACE (Affinity capture elution) [3, 5].

2 **Материалы и методы**

В исследовании был использован препарат RPH-075 (АО «Р-Фарм», Россия), содержащий пембролизумаб в концентрации 25 мг/мл. В качестве положительного контрольного образца на нейтрализующие антитела использовали Anti-Pembrolizumab, антитела к пембролизумабу лиофилизированные, концентрат, 1 мкг/мл (Реагент Набора для определения KRIBIOLISATM Anti-Pembrolizumab (KEYTRUDA®) ELISA, Индия)). Эукариотический рекомбинантный белок PD-1, (Cloud-Clone Corp). Для иммунохимического анализа использовали планшеты 96-луночные, прозрачные, плоскодонные, высокое связывание Costar® (2592, Corning Inc., США). Получение конъюгата пембролизумаба с пероксидазой хрена осуществляли по методу Накане [15]. Для биотинилирования PD-1 использовали набор (ООО «Силекс», Россия).

Для проведения теста на устойчивость методики к присутствию лекарственного препарата готовили модельные образцы, путем добавления к пуллированной сыворотке крови здоровых доноров препарата

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DAV-3188

пембролизумаба (до 40 мкг/мл, что соответствовало ожидаемой концентрации препарата в исследуемых образцах) и контрольных антител к пембролизумабу, препятствующих его связыванию с мишенью. Перед проведением анализа полученные модельные образцы оставляли инкубироваться при комнатной температуре по меньшей мере в течение 60 минут для образования иммунных комплексов.

Методика определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека иммуноферментным методом с иммобилизованным пембролизумабом (методика 1). Этапы проведения анализа схематически представлены на Рис.1.1.

Пембролизумаб сорбировали в 0,02 М фосфатном буфере (pH 7,2) в концентрации 0,75 мкг/мл. Планшеты выдерживали в течение 19-22 часов при температуре (4-8) ^{0}C и блокировали раствором 0,09% казеината в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,05% Твин 20. Далее во все лунки с иммуносорбентом вносили по 60 мкл 600 мМ уксусной кислоты и по 10 мкл анализируемых образцов и инкубировали при температуре 37 ^{0}C в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Далее во все лунки вносили по 30 мкл 1М трис-буфера и инкубировали при температуре 37 ^{0}C в течение 60 минут и перемешивании 700 об/мин. После во все лунки с вносили по 100 мкл PD-1, конъюгированного с биотином в концентрации 250 нг/мл и инкубировали при температуре 37 ^{0}C в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Затем во все лунки с вносили по 100 мкл стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена и инкубировали при температуре 37 ^{0}C в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Далее отмывали не связавшиеся реагенты и вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм.

Методика определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека иммуноферментным методом с использованием техники ACE (Acid capture elution) (методика 2).

Техника ACE включает в себя следующие этапы, схематически представленные на Рис.1.2.

Иммуносорбент №1. Пембролизумаб сорбировали в 0,02 М фосфатном буфере (pH 7,2) в концентрации 40 мкг/мл. Далее планшеты блокировали согласно методике 1.

Иммуносорбент №2. PD-1 сорбировали в корбонатном буфере (pH 9,6) в концентрации 100 нг/мл. Далее планшеты блокировали согласно методике 1.

Во все лунки с Иммуносорбентом №1 вносили по 80 мкл 600 мМ уксусной кислоты и по 20 мкл анализируемых образцов и инкубировали при температуре 37 ^{0}C в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. Далее во все лунки вносили по 40 мкл 1М трис-буфера и инкубировали при температуре

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

37 ^{0}C в течение 90 минут и перемешивании 700 об/мин. После проводили отмывание не связавшихся компонентов и вносили по 110 мкл 300 мМ уксусной кислоты далее инкубировали при температуре 37 ^{0}C и перемешивании 700 об/мин в течение 30 минут. Далее в планшет для предварительного разведения вносили по 30 мкл 1М трис-буфера и по 100 мкл диссоциированных образцов из Иммуносорбента №1. Следом вносили по 25 мкл рабочего конъюгата, пембролизумаба конъюгированного с пероксидазой хрена и инкубировали при температуре 37 ^{0}C и перемешивании 700 об/мин в течение 30 минут.

После инкубации с конъюгатом переносили по 100 мкл во все лунки Иммуносорбента №2 и инкубировали при температуре 37 ^{0}C в течение 30 минут и перемешивании 700 об/мин. После отмывания не связавшихся компонентов визуализацию результатов анализа и замер проводили, как описано выше.

При наличии нейтрализующих антител в образце пембролизумаб, конъюгированный с пероксидазой хрена не взаимодействует или взаимодействует ограниченно с PD-1 на планшете.

Статистическая обработка результатов.

Полученные данные анализировали с помощью программных обеспечений SPSS Statistics (IBM) и Microsoft Office Excel 2019.

3 **Результаты**

Основной задачей разработки методики по определению НАТ к пембролизумабу являлась чувствительность не менее 100 нг/мл в присутствии данного препарата на уровне до 40 мкг/мл (что соответствовало ожидаемой концентрации препарата в исследуемых образцах). Поскольку при разработке и валидации методики отсутствовали клинические образцы, содержащие нейтрализующие антитела к пембролизумабу, оценка была сделана с использованием суррогатных нейтрализующих антител из коммерческого набора, с подтвержденной способностью препятствовать связыванию пембролизумаба с мишенью.

В данной работе на стадии разработки для определения нейтрализующих антител к пембролизумабу сравнивали две методики с разным способом ингибирования связывания пембролизумаба с PD-1. Схематично методики представлены на Рис.1.

В сравниваемых методиках для дифференциации отрицательных образцов от положительных использовали индекс позитивности (ИП), т.е. отношение ОПобразца/$ОП_{PSCP}$, $ОП_{PSCP}$ (plate-specific cut point-PSCP, предел исключения, порогового значения оптической плотности, рассчитываемого для каждого планшета), рассчитывали по формуле:

$ОП_{PSCP} = (ОП_{NC\ средн.} + ОП_{100\ нг/мл})/2$ (1), где

$ОП_{NC\ средн.}$ – среднее арифметическое значение ОП контрольной пулированной сыворотки крови, не содержащей антитела к лекарственному препарату (NC), в 4-х повторах;

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

$ОП_{100\ нг/мл}$ - среднее арифметическое значение ОП контрольной пулированной сыворотки крови, нагруженной 100 нг/мл коммерческих антител к лекарственному препарату, в 4-х повторах. Чувствительность ≤ 100 нг/мл принималась как приемлемая.

Образцы с ИП ≤ 1 считались содержащие НАТ к пембролизумабу, а с ИП>1 не содержащие НАТ к пембролизумабу.

Влияние циркулирующего пембролизумаба оценивали, как в холостой контрольной пробе (пулированная сыворотка крови человека 10 здоровых доноров, не содержащая антитела к пембролизумабу) так и в контрольной пробе, нагруженной коммерческими нейтрализующими антителами к пембролизумабу на уровне 100 нг/мл.

При оценке методики, соответствующей схеме 1.1. не было выполнено требование по необходимой чувствительности методики 100 нг/мл. При изучении показателей чувствительности и лекарственной толерантности положительный результат был получен только в образце, содержащего 1000 нг/мл НАТ в присутствии 40 мкг/мл пембролизумаба (см. Рисунок 2).

В свою очередь результаты данного исследования показали, что, при использовании предварительной обработки образцов методом ACE были получены результаты, соответствующие критериям приемлемости для данной методики. Все холостые образцы на всех уровнях тестируемого циркулирующего лекарственного препарата были правильно классифицированы как отрицательные (ИП>1). В то время как образцы, содержащие НАТ на уровне 100 нг/мл были определены как положительные при концентрации пембролизумаба 40 мкг/мл (см Рисунок 1). Таким образом для дальнейшей валидации при определении НАТ к пембролизумабу была выбрана методика с использованием техники ACE.

Предел исключения, чувствительность, специфичность.

При валидации методики проведено сравнение расчета $ОП_{PSCP}$ по формуле (1) и при помощи ROC-анализа, где $ОП_{PSCP}$ определяли, как значение ОП, в котором специфичность и чувствительность равны 100%, что указывает на способность методики однозначно классифицировать образцы на положительные и отрицательные. При этом в каждом аналитическом цикле (проведении анализа в индивидуальном планшете) используется плавающий предел исключения $ОП_{PSCP.}$

Для валидации тест-системы были проанализировали 60 образцов сывороток крови человека параллельно в виде холостых образцов и в виде образцов, нагруженных коммерческими антителами к пембролизумабу (Krishgen BioSystems) до концентрации 100 нг/мл. Анализ выполняли в рамках трёх валидационных серий, каждая из которых включала 20 пар образцов, исходных и с добавкой. Результаты сравнения двух подходов к определению $ОП_{PSCP}$ представлены в таблице 1.

Устойчивость методики к присутствию лекарственного препарата

Для оценки возможности методики получать устойчивые результаты и детектировать антитела в присутствии биологического препарата была

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DAV-3188

проведена оценка ее толерантности к присутствию лекарственного препарата (drug tolerance). Для этого были проанализированы образцы на двух уровнях концентраций антител к пембролизумабу 250 нг/мл (MPC) и 100 нг/мл (LPC**)** с добавлением и без добавления лекарственного препарата до уровня концентрации 20 и 40 мкг/мл в образце. Для интерпретации полученных данных рассчитали относительное отклонение значений оптической плотности для образцов с добавлением и без добавления препарата. Критерием приемлемости является сохранение аналитического отклика положительных образцов ниже $ОП_{PSCP}$.

Результаты представлены в Табл. 2, и показывают, что все образцы, содержащие антитела к пембролизумабу в концентрации 100 и 250 нг/мл, в присутствии пембролизумаба до 40 мкг/мл определялись как содержащие нейтрализующие антитела к лекарственному препарату, что соответствует необходимому уровню толерантности.

Прецизионность

Для оценки прецизионности использовали образцы трех уровней концентраций 500 нг/мл (HPC), 250 нг/мл (MPC), 100 нг/мл (LPC) и NC. Для оценки использовали шесть независимых контрольных образцов каждого уровня концентрации. Для интерпретации полученных данных рассчитали КВ, % значений оптической плотности для образцов каждого уровня концентрации в аналитическом цикле.

Использовали следующие критерии приемлемости: значения ОП для контрольных образцов в подтверждающем тесте соответствовали: $ОП_{HPC}<ОП_{MPC}<ОП_{LPC}<PSCP<NC$. Коэффициент вариации (КВ) не должен превышать 20% для положительных образцов. Коэффициент вариации внутри каждого из 6 циклов для каждого контрольного образца не превышал 8%, данные по воспроизводимости между циклами представлены в Таблице 3.

Специфичность

Специфичность это способность однозначно оценивать определяемое вещество и не давать перекрестной реактивности со структурно родственными соединениями. Так как пембролизумаб является гуманизированным моноклональным антителом, включающим гипервариабельным участком иммуноглобулина мыши, то в качестве его структурно родственного соединения были выбраны другие лекарственные препараты – олокизумаб и трастузумаб**.** Для оценки специфичности использовали образцы пембролизумаба (100 нг/мл) и NC в вариантах без добавки или с добавкой антител к олокизумабу (на уровне 1000 нг/мл). По результатам анализа усредненное значение ОП должно быть ниже PSCP для LPC и выше PSCP для интактной сыворотки.

«Хук»-эффект и линейность отклика

Наблюдалось снижение оптической плотности градуировочных образцов с увеличением концентрации антител к пембролизумабу (обратная зависимость), что позволило доказать отсутствие «хук»-эффекта до концентрации 1000 нг/мл. В данном исследовании верхняя точка проверки

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

диапазона была ограничена концентрацией образца положительного контроля, используемой ИФА тест-системы.

4 **Обсуждение**

Решение Коллегии ЕЭК № 89 [1] допускает при невозможности (недоступности) нейтрализующих методов количественного определения на основе клеток использовать методы конкурентного связывания с лигандом или другие альтернативы. Однако при их использовании необходимо обосновать, что данные методы отражают нейтрализующую способность (активность) исследуемых антител [8]. Для такого обоснования можно учесть точку зрения Руководства FDA [6], которое в вопросах обоснования неклеточного подхода ссылается на работу [19], в которой описываются его следующие научные обоснования: исследуемый препарат блокирует белок-мишень (особенно, если препарат представляет собой моноклональное антитело); для реализации действия препарат не должен попадать внутрь клетки. Действительно, препарат пембролизумаб соответствует данным условиям: он является моноклональным антителом, блокирующим PD-1; механизм действия пембролизумаба реализуется на поверхности клеток Т-лимфоцитов, на которых располагаются рецепторы PD-1. В любом из указанных тестов серьезной проблемой является циркулирующеее лекарственное средство, при этом его присутствие даже в минимальных количествах может значительно повлиять на результаты анализа, вызывая ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Наличие циркулирующих моноклональных антител приводит к тому, что нейтрализующие антитела в формате анализа связывания с иммобилизованным препаратом вступают в иммунный комплекс с препаратом в образце, тем самым препятствуя их обнаружению и приводя к ложноотрицательному результату. Высокие концентрации циркулирующего лекарственного средства также могут связываться с мишенью, используемой в анализе, что будет конкурировать с лекарственным средством, используемым в качестве детекторного реагента в анализе, и подавлять сигнал, приводя к ложноположительному результату. Такие затруднения могут повлиять на интерпретацию результатов анализа, что приведет к серьезным последствиям, как для безопасности пациентов, так и для производителей данных препаратов в случае ложноположительной иммуногенности препарата. В научных публикациях описаны различные подходы для устранения влияния циркулирующего лекарственного средства на результат анализа [14, 16, 21, 23, 24, 25].

В нашем исследовании мы предложили подход для определения нейтрализующих антител к пембролизумабу, позволяющий решить проблему вмешательства циркулирующего терапевтического моноклонального антитела (до 40 мкг/мл), присутствовавшего в анализируемых образцах. На первом этапе проводили кислотную диссоциацию иммунного комплекса, далее применяли технику ACE и проводили анализ конкурентного связывания PD-1 с пембролизумабом, конъюгированным с пероксидазой хрена.

10.15789/1563-0625-DAV-3188

Свою роль играет и то, что для определения иммуногенности, как связывающих, так и нейтрализующих антител нет эталонного стандарта, который мог бы достоверно оценивать иммуногенность к данному препарату. Поэтому при разработке анализов, в том числе на нейтрализующие антитела, на данный момент используют суррогатные контроли, которые могут обладать не такой иммуногенностью, как нейтрализующие антитела, продуцируемые против препарата у пациентов. Тем не менее мировая практика при изучении иммуногенности использует данные контроли при невозможности использования другого варианта [13, 21]. При этом при разработке на нейтрализующие антитела главным критерием методики является демонстрация потери функциональной активности препарата, и суррогатные контроли в этом случае достоверно имитируют данный механизм.

5 **Выводы**

Была разработана и валидирована методика выявления нейтрализующих антител к пембролизумабу, основанная на ингибировании пембролизумаба с его мишенью PD-1 в сочетании с техникой ACE.

Благодаря применению подходов, описанных в данной работе к предварительной обработке образцов для анализа нейтрализующих антител, была достигнута лекарственная толерантность при рекомендованной чувствительности 100 нг/мл в присутствии циркулирующего пембролизумаба 40 мкг/мл.

Был обоснован метод расчета предела исключения, чувствительности и селективности на основании ROC-анализа и плавающего предела исключения (PSCP) через средние арифметические значения ОП NC и LPC в каждом индивидуальном аналитическом планшете.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Результаты определения предела исключения при помощи ROC-анализа и по формуле (1), метода расчета при использовании в расчете $ОП_{PSCP}$ среднего арифметического значений ОП отрицательных образцов и ОП этих же образцов, нагруженных антителами к пембролизумабу до концентрации 100 нг/мл.

Table 1. The results of determining the exclusion limit using ROC analysis and formula (1), a calculation method using the arithmetic mean of the OD of negative samples and OD of the same samples loaded with antibodies to pembrolizumab up to a concentration of 100 ng/ml.

Наименование параметра **Parameter**	**1 цикл анализа, n=20** **1 cycle of analysis, n=20**	**2 цикл анализа, n=20** **2 cycle of analysis, n=20**	**3 цикл анализа, n=20** **3 cycle of analysis, n=20**
Чувствительность, 95% ДИ **Sensitivity, 95% DI**	100% (83,89% - 100,0%)	100% (83,89%- 100,0%)	100 % (83,89%- 100,0%)
Специфичность, 95% ДИ **Specificity, 95% CI**	100 % (83,89% - 100,0%)	100% (83,89% - 100,0%)	100% (83,89%- 100,0%)
$ОП_{PSCP}$, рассчитанный по ROC-кривой **$ОП_{PSCP}$, calculated from the ROC curve**	1,923	1,692	1,924
$ОП_{PSCP}$, рассчитанный по формуле (1) **$ОП_{PSCP}$, calculated according to the formula (1)**	1,924	1,709	1,953
p-val	<0,0001	<0,0001	<0,0001

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

Таблица 2. Результаты устойчивости к лекарственному препарату. СО (SD)-стандартное отклонение, КВ, % (CV, %)-коэффициент вариации. Контроли LPC-100 нг/мл MPC-250 нг/мл содержатантител к пембролизумабу в присутствии пембролизумаба 20 мкг/мл (+ 20 мкг/мл) и 40 мкг/мл (+40 мкг/мл).
Table 2. The results of drug tolerance. CO (SD) is the standard deviation, KV, % (CV, %) is the coefficient of variation. Control LPS-100 ng/ml MP-250 ng/ml contain antibodies to pembrolizumab in the presence of pembrolizumab 20 μ/ml (+ 20 μ/ml) and 40 μ/ml (+40 μ/ml).

Образец **Sample**	**Оптическая плотность** **Optical density** OD_{PSCP} / $ОП_{PSCP}$ = 2,0259				**Среднее** **Mean**	**СО** **SD**	**КВ, %** **CV, %**
	ОП1	ОП2	ОП3	ОП4			
LPC	1,376	1,235	1,261	1,380	1,313	0,08	5,8
MPC	0,805	0,753	0,764	0,742	0,766	0,03	3,6
LPC+AT, 20 μg/ml	1,359	1,517	1,471	1,660	1,501	0,12	8,3
LPC+AT, 40 μg/ml	1,890	1,674	1,537	1,683	1,696	0,15	8,6
MPC+AT, 20 μg/ml	0,827	0,998	0,987	0,812	0,906	0,10	11,1
MPC+AT, 40 μg/ml	1,033	1,033	0,984	1,082	1,033	0,04	3,9
NC	2,232	2,243	2,238	2,297	2,252	0,03	1,3

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

Таблица 3. Прецизионность методики определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу в ходе шести серий. СО-стандартное отклонение, КВ, %,-коэффициент вариации.

Таблица 3. The precision of the method for determining the neutralizing activity of antibodies to pembrolizumab during six series. SD is the standard deviation, %, CV, % is the coefficient of variation.

Образец Sample	Оптическая плотность Optical density								КВ, % CV, %
	1	2	3	4	5	6	Среднее Mean	СО SD	
НРС	0,697	0,730	0,540	0,489	0,575	0,644	0,612	0,094	15,3
МРС	0,910	0,901	0,707	0,868	0,875	0,924	0,864	0,080	9,2
LPC	1,493	1,490	1,258	1,188	1,406	1,503	1,390	0,136	9,8
NC	2,376	2,414	2,298	2,240	2,333	2,424	2,347	0,071	3,0
PSCP	1,935	1,952	1,778	1,714	1,869	1,963	1,869	0,093	5,0

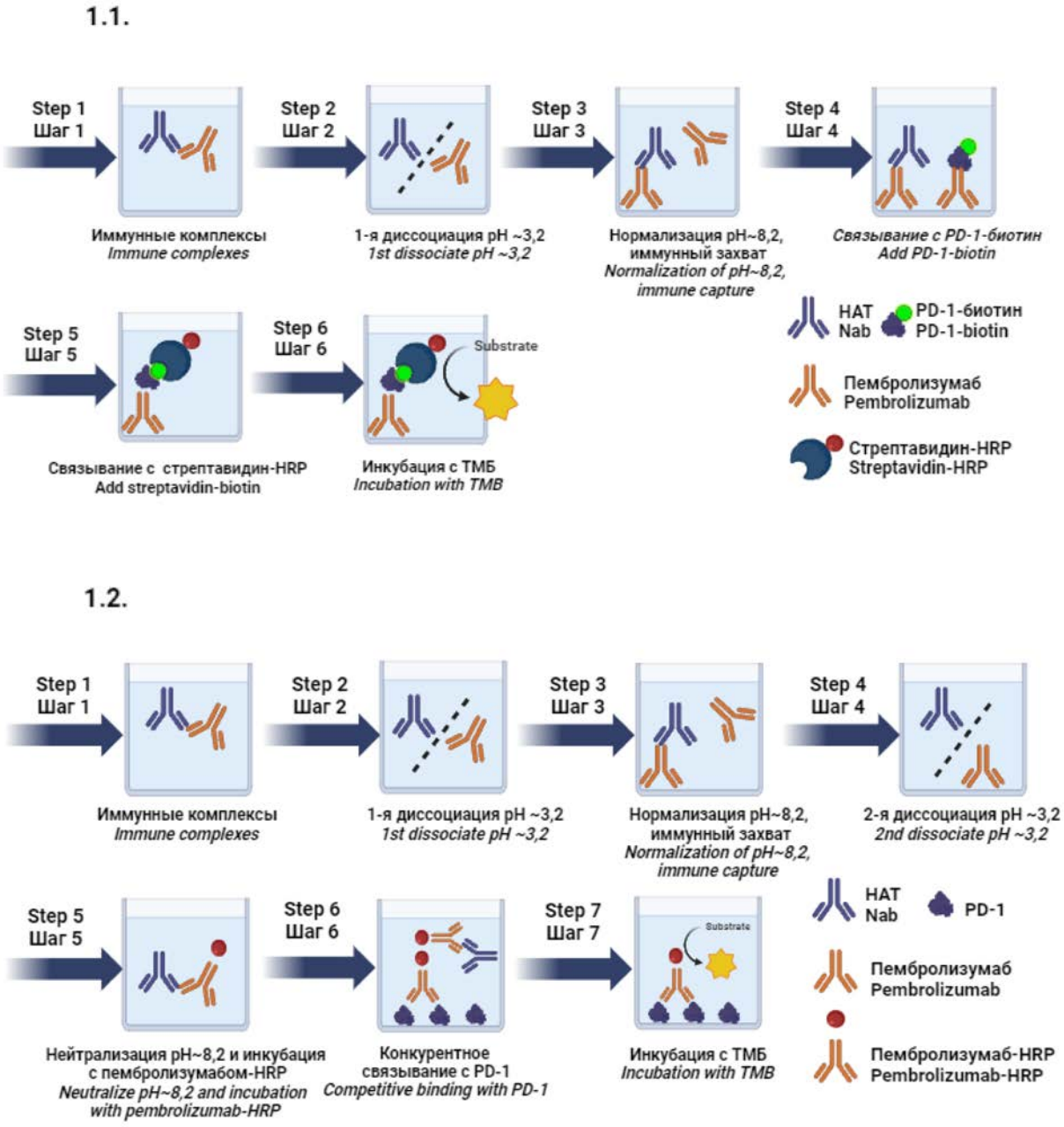
ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

РИСУНКИ

Рисунок 1. Этапы определения нейтрализующей активности антител к пембролизумабу в сыворотке крови человека иммуноферментным методом через иммобилизованный пембролизумаб 1.1. и с использованием техники ACE (Acid capture elution) 1.2.

Figure 1. Determination of the neutralizing activity of antibodies to pembrolizumab in human blood serum by ELISA with immobilized pembrolizumab 1.1. and using ACE (Acid capture elusion) technique 1.2.



ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

Рисунок 2. Оценка чувствительности методик в присутствии свободного пембролизумаба 40 мкг/мл. ИП-индекс позитивности.

Figure 2. Assessment of the sensitivity of the techniques in the presence of free pembrolizumab 40 mcg/ml. IP is an index of positivity.

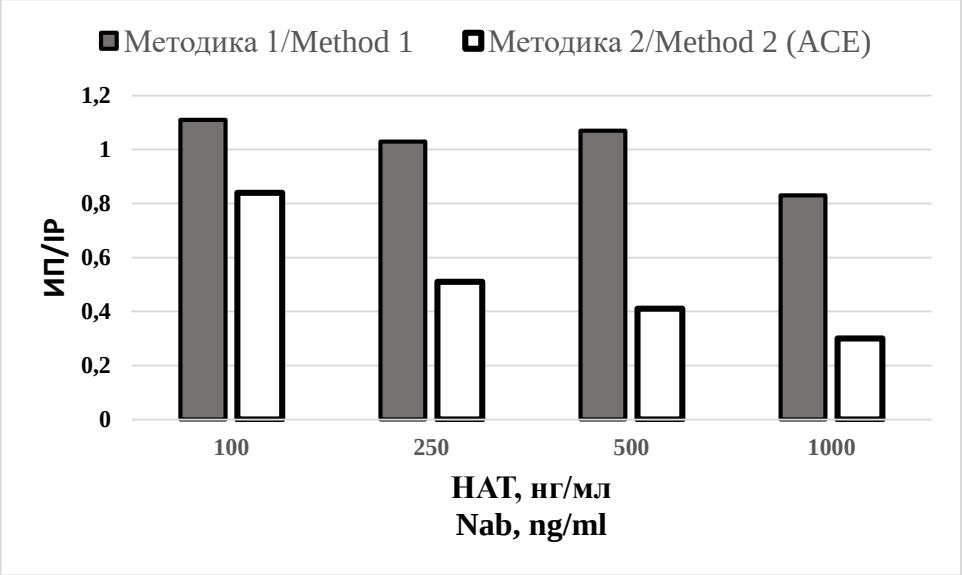
ИП / IP

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

Рисунок 3. Зависимость оптической плотности (ОП) от концентрации антител к пембролизумабу, обратная зависимость.

Figure 3. The dependence of optical density (OD) on the concentration of antibodies to pembrolizumab, the inverse relationship.



ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку
Кудряшова Александра Михайловна,
научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии, ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова;
адрес: Служебный адрес: РФ, Москва, 1-я Дубровская улица, д. 15;
тел. сотовый: 8(903)223-82-50;
тел. служебный: 8(495)674-54-97;
e-mail: 2238250@rambler.ru;
Kudryashova Alexandra Mikhailovna,
researcher of laboratory of medical biotechnology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera;
address: Russia, Moscow, 1-ya Dubrovskayas treet, 15.
mobile phone: 8(903)223-82-50;
office phone: 8(495)674-54-97;
e-mail: 2238250@rambler.ru

Блок 2. Информация об авторах
Гребенкин Дмитрий Юрьевич. кандидат фармацевтических наук, заведующий лабораторией. ООО «Экзактэ Лабс». 117246, Россия, Москва, Научный проезд, 20, стр.2.
Grebenkin Dmitry Yuryevich, Ph.D., chief of laboratory. Exakte Labs LLC. 117246, Nauchny proezd, p. 2, Moscow, 117246, Russia.

Самсонов Михаил Юрьевич - кандидат медицинских наук, директор медицинского департамента.
Samsonov Mikhail Yuryevich - Ph.D., Director of the Medical Department R-Pharm JSC. 119421, Leninsky Prospekt, room 1, Moscow, 119421, Russia.

Филон Ольга Владимировна - директор департамента доклинической и клинической разработки. АО "Р-Фарм". 119421, Россия, Москва, Ленинский пр-т, д. 111, к. 1.
Filon Olga Vladimirovna - Director of the Department of Preclinical and Clinical Development. R-Pharm JSC. 119421, Leninsky Prospekt, room 1, Moscow, 119421, Russia.

Разживина Виктория Александровна - кандидат биологических наук, руководитель отдела клинических исследований АО "Р-Фарм". 119421, Россия, Москва, Ленинский пр-т, д. 111, к. 1.
Razzhivina Victoria Aleksandrovna - Ph.D., Head of the Clinical Research Department. R-Pharm JSC. 119421, Leninsky Prospekt, room 1, Moscow, 119421, Russia.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DAV-3188

Чернобровкин Михаил Геннадьевич - кандидат химических наук, заведующий лабораторией ООО «Рисерч лаб». 117218, Россия, Москва, ул. Кржижановского, д. 15, к. 5, этаж 2 ПОМ.V, КОМ. 201, ОФ.2.
Chernobrovkin Mikhail Gennadievich - Candidate of Chemical Sciences, Head of the Laboratory. Research Lab LLC. 117218, Russia, Moscow, Krzhizhanovskogo str., 15, room 5, floor 2 ROOM.V., ROOM 201, OFFICE 2.

Борисова Ольга Васильевна, кандидат химических наук, заведующий лабораторией. [1]ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. 105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а.
Borisova Olga Vasilievna, Ph.D., chief of laboratory. [1]Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera5a Maly Kazenniy Lane, Moscow, 105064, Russia

Блок 3. Метаданные статьи

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ПЕМБРОЛИЗУМАБУ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ИНГИБИРОВАНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ПЕМБРОЛИЗУМАБА С ЕГО МИШЕНЬЮ PD-1 МЕТОДОМ ИФА

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR DETERMINING NEUTRALIZING ANTIBODIES TO PEMBROLIZUMAB IN HUMAN SERUM BASED ON INHIBITION OF BINDING OF PEMBROLIZUMAB TO ITS PD-1 TARGET BY ELISA

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:
НАТ К ПЕМБРОЛИЗУМАБУ ИФА
NAB TO PEMBROLIZUMAB ELISA

Ключевые слова: ИФА; пембролизумаб; иммуногенность; нейтрализующие антитела; PD-1; клинические исследования; лекарственная толерантность; валидация.
Keywords: ELISA, immunogenicity, pembrolizumab, neutralizing antibodies, PD-1, clinical trials, drug tolerance, validation.

Иммунологические методы.
Количество страниц текста – 9,
Количество таблиц – 3,
Количество рисунков – 3.
06.02.2025

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».	Decision of the EEC Council dated 03.11.2016 No. 89 "On approval of the Rules for Conducting Research on Biological Medicinal Products of the Eurasian Economic Union".	----------
2	Butterfield A. M., Chain J. S., Ackermann B. L., & Konrad, R. J. Comparison of assay formats for drug-tolerant immunogenicity testing. Bioanalysis, 2010, 2 no. 12, pp. 1961–1969.		DOI: 10.4155/bio.10.136.
3	Chen Y. Q., Thomas G Pottanat T.G., Carter Q.L., Troutt J.S., Konrad R.J., Sloan J.H. Affinity capture elution bridging assay: a novel immunoassay format for detection of anti-therapeutic protein antibodies .Journal of Immunological Methods, 2016, vol. 431, pp. 45-51.		DOI: 10.1016/j.jim.2016.02.008
4	Baxi S., Yang A., Gennarelli R.L., Khan N., Wang Z., Boyce L., Deborah K. Immune-related adverse events for		DOI: 10.1136/bmj.k793.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DAV-3188

	anti-PD-1 and anti-PD-L1 drugs: systematic review and meta-analysis. BMJ, 2018, vol.17:360:k793.		
5	Bourdage J.S., Cook C.A., Farrington D.L., Chain J.S., Konrad R.J. An Affinity Capture Elution (ACE) assay for detection of anti-drug antibody to monoclonal antibody therapeutics in the presence of high levels of drug. Journal of immunological methods, 2007, vol. 327, no.1-2, pp. 10-7.		DOI: 10.1016/j.jim.2007.07.004.
6	FDA: Guidance for Industry: Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products – Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) January. 2019.		**---------**
7	Gupta S., Indelicato S.R., Jethwa V., Kawabata T., Kelley M., Mire-Sluis A.R., Richards S. M., Rup B., Shores E., Swanson S.J., Wakshull E. Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses		DOI: 10.1016/j.jim.2006.12.004.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

	elicited to biological therapeutics. Journal of immunological methods. 2007, vol. 321, no.1-2, pp. 10-18.		
8	Gunn 3rd. G. R., Sealey D. C. F., 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, vol. 184, no. 2, pp. 137-146.		DOI: 10.1111/cei.12742.
9	Hu J, Wala I, Han H, Nagatani J, Barger T, Civoli F., Kaliyaperumal A., Zhuang Y., Shalini Gupta S. Comparison of cell-based and non-cell based assay platforms for the detection of clinically relevant anti-drug neutralizing antibodies for immunogenicity assessment of therapeutic proteins. Journal of Immunological Methods, 2015, vol. 321, no. 1-2, pp. 1–18.		DOI: 10.1016/j.jim.2006.12.004.
10	Khoja L., Day D., Wei-Wu Chen T., Siu L.L., Hansen AR. Tumour- and class-specific patterns of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a		DOI: 10.1093/annonc/mdx286.

10.15789/1563-0625-DAV-3188

	systematic review. Ann Oncol, 2017, vol. 28, no. 10, pp. 2377–85.		
11	Knezevic I., Kang H.N., Thorpe R. Immunogenicity assessment of monoclonal antibody products: a simulated case study correlating antibody induction with clinical outcomes. Biologicals, 2015, vol. 43, no. 5, pp. 5307–17.		DOI: 10.1016/j.biologicals.2015.06.009.
12	Krishna M., Nadler S. G. Immunogenicity to biotherapeutics–the role of anti-drug immune complexes. Frontiers in immunology, 2016, vol., pp.721.		DOI: 10.3389/fimmu.2016.00021.
13	Mora J., Palmer R., Wagner L., Wu B., Partridge M. 2023 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: ISR for ADA Assays, the Rise of dPCR vs qPCR, International Reference Standards for Vaccine Assays, Anti-AAV TAb Post-Dose Assessment, NanoString Validation, ELISpot as Gold Standard (Part 3 - Recommendations on Gene Therapy, Cell Therapy, Vaccines Immunogenicity & Technologies; Biotherapeutics Immunogenicity & Risk Assessment; ADA/NAb Assay/Reporting Harmonization). Bioanalysis, 2024, vol. 16, no. 7, pp.77–119.		DOI:119.10.4155/bio-2024-0024.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

14	Niu H., Klem T., Yang J., Qiu Y., Pan L. A biotin-drug extraction and acid dissociation (BEAD) procedure to eliminate matrix and drug interference in a protein complex anti-drug antibody (ADA) isotype specific assay. J Immunol Methods, 2017, no. 446, pp. 30-36.		DOI:10.1016/j.jim.2017.04.002.
15	Nakane P.K., Kawaoi A. J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. Histochem. Cytochem, 1974, vol. 22, no. 2, pp.1084-1091.		DOI: 10.1177/22.12.1084.
16	Nath N., Flemming R., Godat B., Urh M. Development of NanoLuc bridging immunoassay for detection of anti-drug antibodies. J Immunol Methods, 2017, no. 450, pp. 17-26.		DOI:10.1016/j.jim.2017.07.006.
17	Sasson S. C., Wilkins L. E., Watson R. A., Jolly C., Brain O., Klenerman P., Olsson-Brown A., Fairfax B. Identification of neutralising pembrolizumab anti-drug antibodies in patients with melanoma. Sci Rep, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 19253.		DOI:10.1038/s41598-021-98700-7.
18	Shankar G., Arkin S., Cocea L., Devanarayan V., Kirshner S., Kromminga A., Quarmby V., Richards S., Schneider C. K., Subramanyam M., Swanson S., Verthelyi D., Yim S. American Association of Pharmaceutical Scientists Assessment and reporting of the clinical immunogenicity		DOI: 10.1208/s12248-014-9599-2.

10.15789/1563-0625-DAV-3188

	of therapeutic proteins and peptides-harmonized terminology and tactical recommendations. AAPS J., 2014, no. 16, pp. 658–73.		
19	Richards S. Amaravadi L., Pillutla R., Birnboeck H., Torri A., Kyra J Cowan K.J., Papadimitriou A., Garofolo F., Satterwhite C., Piccoli S., Wu B., Krinos-Fiorotti C., Allinson J., Berisha F., Cocea L., Croft S., Fraser S., Galliccia F., Gorovits B., Gupta S., Gupta V., Haidar S., Hottenstein C., Ishii-Watabe A., Jani D., Kadavil J., Kamerud J., Kramer D., Litwin V., Santos G.M.L., Nelson R., Ni Y., Pedras-Vasconcelos J., Qiu Y., Paul Rhyne P., Safavi A., Saito Y., Savoie N., Kara Scheibner K., Schick E., Siguenza P. Y., Smeraglia J., Staack R.F., Subramanyam M., Sumner G., Thway T., Uhlinger D., Ullmann M., Vitaliti M., Welink J., Whiting C.C., Xue L., Zeng R. White Paper on recent issues in bioanalysis: focus on biomarker assay validation (BAV):(Part 3–LBA, biomarkers and immunogenicity). Bioanalysis, 2016, vol. 8, no. 23, pp. 2475-2496.		DOI: 10.4155/bio-2016-4989.
20	Wadhwa M., Knezevic I., Kang H.N., Thorpe R. Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: an		DOI:0.1016/j.biologicals.2015.06.004.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

	overview of assays and their utility. Biologicals, 2015, no. 43, pp. 298–306.		
21	Weiner J. A. , Natarajan H., Calum J., McIntosh C., Yang E. S., Choe M., Papia C. L., Axelrod K. S., Gabriela Kovacikova G., Pegu A., Ackerman M.E. Selection of positive controls and their impact on anti-drug antibody assay performance. J Immunol Methods, 2024, no. 528, pp. 113657.		DOI:10.1016/j.jim.2024.113657.
22	Wu B, Chung S, Jiang X-R., McNally J., Pedras-Vasconcelos J., Pillutla R, White J. T., Xu Y., Gupta S. Strategies to determine assay. format for the assessment of neutralizing antibody responses to biotherapeutics. The AAPS journal, 2016, vol. 18, no. 6, pp. 1335-50.		DOI:10.1208/s12248-016-9954-6.
23	Wu B.W., Gunn III G.R. Shankar G. Competitive Ligand-Binding Assays for the Detection of Neutralizing Antibodies. Detection and quantification of antibodies to biopharmaceuticals: practical and applied considerations. Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals, 2011, pp. 175-192.		DOI:10.1002/9781118075685.ch10.

24	Wu B., Schnarr M., Devlin J. L., Brown S., Yang T-Y. Approaches to improve drug tolerance and target tolerance in the assessment of neutralizing anti-drug antibodies. Bioanalysis, 2019, vol. 11, no. 22, pp. 2061-2074.		DOI:10.4155/bio-2019-0184.
25	Xiang Y., Parng C., Olson K., Seletskaia E., Gorovits B., Jani D., Caiazzo T. , Joyce A. , Donley J. Neutralizing antibody assaydevelopment with high drug and target tolerance to support clinical development of an anti-TFPI therapeutic monoclonal antibody. The AAPS Journal, 2019, vol. 21 no. 3, pp. 1-10.		DOI: 10.1208/s12248-019-0320-3.
26	Zoghbi J., Xu Y., Grabert R., Theobald V., Richards S. A breakthrough novel method to resolve the drug and target interference problem in immunogenicity assays. J Immunol Methods, 2015, no.426, pp. 62-69.		DOI: 10.1016/j.jim.2015.08.002.