

**Валидация тест-системы для количественного определения концентрации трастузумаба в биологических жидкостях методом твердофазного иммуноферментного анализа**

**В.В. Писарев, А.В. Иванов**

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственный центр Пробиотек». Ленинские Горы, д.1, стр. 75В, Москва, 119992, Российская Федерация  
[vladimir.pisarev@probiotech.ru](mailto:vladimir.pisarev@probiotech.ru)  
+7-916-577-73-58

**Актуальность.** Трастузумаб является препаратом выбора для терапии HER2+ рака молочных желез. Для определения фармакодинамики препарата при персонализированной терапии необходима валидированная биоаналитическая методика определения концентрации препарата в биологических жидкостях. **Цель работы:** создание и оценка пригодности (валидация) тест-системы на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) для количественного определения концентрации трастузумаба в сыворотке/плазме крови человека. **Материалы и методы:** Представленная тест-система является классическим ИФА набором с 96-луночным полистероловым планшетом, лунки которого покрыты специфическими к трастузумабу моноклональными антителами, вторичными козьими антителами к Fc фрагменту, конъюгированными с пероксидазой хрена, субстратного раствора – (3,5,3',5')-тетраметилбензидина (ТМБ) и стоп-раствора. Растворы для контроля качества готовились путём разведения известных концентраций трастузумаба в бланковой сыворотке. **Результаты:** в ходе работы установлены предел обнаружения (0,84 нг/мл) и нижний предел количественного определения (1,41 нг/мл) трастузумаба в сыворотке/плазме крови, доказана высокая селективность определения аналита в многокомпонентной матрице. Найденные средние значения концентраций трастузумаба не отклонялись от номинальных значений более чем 11,42% во всём диапазоне определяемых концентраций, внутри- и межсерийная прецизионность тест-системы не превышала 11,31%, общая ошибка метода – 20,0%. Продемонстрированные характеристики позволяют применять данную тест-систему для анализа широкого диапазона концентраций трастузумаба в биологических образцах. Стабильность компонентов тест-системы определена как не меньше 1 года при соблюдении условий хранения. **Заключение:** представленная тест-система соответствует международным валидационным требованиям и пригодна для практического применения.

**Ключевые слова:** трастузумаб, ИФА, валидация, фармакокинетика

**Введение:**

Препараты, нацеленные на рецептор 2 типа эпидермального фактора роста человека (HER2), произвели революцию в лечении пациентов с HER2-положительными злокачественными опухолями молочной железы. Применение таргетных препаратов подобного типа поставило антираковую терапию на новый стандарт превосходных результатов выживаемости для данного агрессивного подтипа рака молочных желез (РМЖ), характеризующегося крайне негативным прогнозом (1-4). В основе таких препаратов лежит трастузумаб, представляющий собой рекомбинантное моноклональное антитело из человеческих консервативных доменов и мышинных вариабельных последовательностей, связывающее внеклеточный домен белка HER2. Механизм действия трастузумаба заключается в значительном подавлении экспрессии HER2. Также он ускоряет эндоцитоз и деградацию рецептора и ингибирует прохождение клеточного цикла через образование комплексов p27Kip1/Cdk2 (5). Трастузумаб, разработанный Genetic Engineering Technology, Inc. (США) в настоящее время выпускается под различными торговыми марками несколькими зарубежными и отечественными компаниями.

Для успешного клинического применения трастузумаба необходимо чётко представлять фармакогенетику препарата, особенно учитывая тот факт, что для каждого случая HER2-положительного РМЖ характерен индивидуальный уровень экспрессии гена *ERBB2*, кодирующего белок HER2. Одним из наиболее практичных способов количественной оценки уровня трастузумаба в крови пациента является применение метода иммуноферментного анализа (ИФА, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Несмотря на наличие на рынке нескольких вариантов тест-наборов ИФА (6) для определения трастузумаба в биологических жидкостях, разработка отечественного продукта с аналогичными или превосходящими характеристиками является актуальной задачей. Для решения данной задачи в ООО «Научно-производственный центр Пробиотек» разработана и подготовлена к практическому применению тест-система на основе «сэндвич»-варианта твердофазного ИФА для количественного определения трастузумаба в биологических жидкостях. Ранее подобный подход был успешно применён для создания аналогичной тест-системы для определения ритуксимаба (7). Выбор метода ИФА обусловлен явными преимуществами подобного подхода по сравнению с другими аналитическими методиками: возможностью количественного определения концентрации исследуемого вещества на основе калибровочной кривой, построенной для каждой постановки наряду с доступностью для использования в рутинной практике клинической лаборатории, особенно по сравнению с методами иммунохемилюминисценции и масс-спектрометрии. К явным преимуществам представленной тест-системы можно отнести невысокую стоимость относительно зарубежных аналогов, возможность быстро наладить массовое производство, технические характеристики, оптимизированные для точного определения концентрации трастузумаба в терапевтических интервалах именно в крови человека.

Целью настоящего исследования является оценка характеристик и пригодности (валидация) данной тест-системы количественного определения трастузумаба в биологических жидкостях человека для последующего применения в области персонализированной фармакокинетики.

### Материалы и методы

#### *Приготовление растворов.*

Для оценки концентрации трастузумаба в биологических жидкостях было приготовлено несколько вариантов растворов. Для построения калибровочной кривой были приготовлены растворы трастузумаба с концентрацией 3, 6, 30, 90, 160, 250, 300 нг/мл, полученные путём разбавления коммерческого препарата концентрацией 120 мг/мл в фосфатно-солевом буфере с добавлением бычьего сывороточного альбумина (БСА) и Твин 20.

Для проведения экспериментов по валидации метода было приготовлено 5 базовых образцов для контроля качества. Образцы для контроля качества с концентрацией трастузумаба 3, 8,5, 150, 225 и 300 нг/мл готовились аналогично калибровочным стандартам с применением в качестве разбавителя бланковой человеческой сыворотки. 10 образцов сыворотки были получены от Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Все измерения с применением биоматериалов человека проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 года. Все доноры заполнили и подписали информированное согласие на участие в этом исследовательском проекте и на публикацию результатов.

Для эксперимента с определением предела чувствительности перед непосредственными измерениями образцы калибровочных растворов и бланковой сыворотки разбавлялись в 5000 раз в два этапа. Непосредственно перед анализом к 940 мкл сыворотки, разбавленной

## Фармакокинетика и Фармакодинамика, 2023, в печати

в 5000 раз, добавлялось 60 мкл раствора трастузумаба с концентрацией 10 нг/мл, далее смесь перемешивалась на вортексе.

Сыворотка с высоким содержанием липидов готовилась по следующей схеме: к 750 мкл бланковой сыворотки приливалось 250 мкл Интралипида 20% (содержание фосфолипидов яичного желтка 12 г/л).

*Выполнение процедуры ИФА* проводилось по достаточно стандартной методике. Перед началом анализа планшет, реакционные компоненты и исследуемые образцы выдерживались при комнатной температуре в течение 30 минут. В соответствующие лунки планшета добавлялось по 100 мкл калибровочных растворов, чистой бланковой сыворотки в качестве отрицательного контроля, бланковой сыворотки с добавлением трастузумаба до определённой концентрации в качестве положительного контроля, экспериментальных образцов сыворотки. Планшет заклеивали пленкой, встряхивали в течение 2 минут на автоматическом шейкере при 500 об/мин и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Далее растворы удаляли и производилась промывка на автоматическом вошере HydroFlex (Tecan, Швейцария) 3 раза по 300 мкл с использованием промывочного буфера, содержащего 0.01 М фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с добавлением 0.05% Твин-20. На втором этапе в каждую лунку вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, содержащего козьи поликлональные антитела против Fc фрагмента IgG человека с пероксидазой хрена (A0170, Sigma-Aldrich, США) в реакционном буфере 0.01М ФСБ и 1% бычьего сывороточного альбумина. Далее следовала вторая отмывка 3 раза по 300 мкл промывочного буфера на автоматическом вошере. Следующим этапом следовало добавление 100 мкл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубация 15 минут в темноте при комнатной температуре. Реакция останавливалась добавлением 100 мкл стоп-раствора, содержащего 1 М серную кислоту. В течение 5 минут после остановки реакции производилась регистрация результатов ИФА с использованием микропланшетного фотометра MRX (Dynex Technologies Inc., США) при длине волны 450 нм.

### *Статистический анализ*

Математическая обработка результатов измерений для валидации метода проводилась в соответствии с рекомендациями (8). Для оценки таких параметров валидации, как среднее значение, стандартное отклонение, коэффициент вариации, правильности (относительной величины систематической погрешности), общей ошибки, а также для регрессионного анализа калибровочной зависимости и расчёта коэффициентов детерминации  $R^2$  применялся пакет анализа стандартных статистических функций электронных таблиц Microsoft Excel 2007 (Статистический пакет Microsoft Office 97 для Windows, Редмонд, США) и онлайн-калькулятор для расчёта статистических критериев «Медицинская статистика» (<https://medstatistic.ru/calculators.html>). Детально процедура математической обработки с формулами описана в (7).

### **Результаты и обсуждение**

Валидация теста определения трастузумаба производилась согласно рекомендациям Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации ЛС для человека (ICH) [9], подтверждённым для применения в РФ (10). Данная процедура включает 9 этапов (11): селективность, точность, воспроизводимость, тест влияния матрицы, тест разбавления матрицы, тест разбавления образца, стабильность при трех циклах замораживания-оттаивания (не менее  $-20^{\circ}\text{C}$ ), стабильность при стоянии образца при комнатной температуре в течение 6 часов, стабильность при долгосрочном хранении (не менее  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

Первоначальным необходимым условием было построение и определение воспроизводимости калибровочной кривой. Результаты измерений представлены на Рисунке 1. При этом измерение концентраций трастузумаба выше 200 нг/мл методом твердофазного ИФА признано нецелесообразным ввиду выхода показателя оптической плотности на плато (Рисунок 1а). При этом с возрастанием концентрации оптическая плотность изменяется крайне незначительно, при этом её показатели не превышают значения 2,5, рекомендованного для точного определения измеряемого компонента (12, 13). Особенности фармакокинетики трастузумаба является ярко выраженный дозозависимый характер. При этом равновесная концентрация в крови пациента составляет 79-123 мгк/мл. Именно под такие значение подбирались оптимальные параметры разработанной тест-системы ИФА. Для построения калибровочной кривой в дизайне тест-системы было использовано 8 калибраторов с заданными значениями концентрации трастузумаба: 0 (бланковый образец), 3, 6, 30, 90, 160, 250, 300 нг/мл. При определении регрессионной модели наилучшие результаты показала квадратичная зависимость (Рисунок 1б). Формулой пересчёта оптической плотности в концентрацию трастузумаба является

$$(1) y=0,0768x^{0,6156}$$

Величина достоверной аппроксимации  $R^2$  составила 0,9843. При обратном расчёте концентраций калибровочных стандартов отклонения от теоретических значений попали в диапазон от -14,8 до 16,5% , что не превосходит допустимые 20% (13).

Рисунок 1а. Зависимость оптической плотности от концентрации трастузумаба (калибровочная кривая).

Figure 1a. Plot of optical density dependence on trastuzumab concentration (calibration curve)

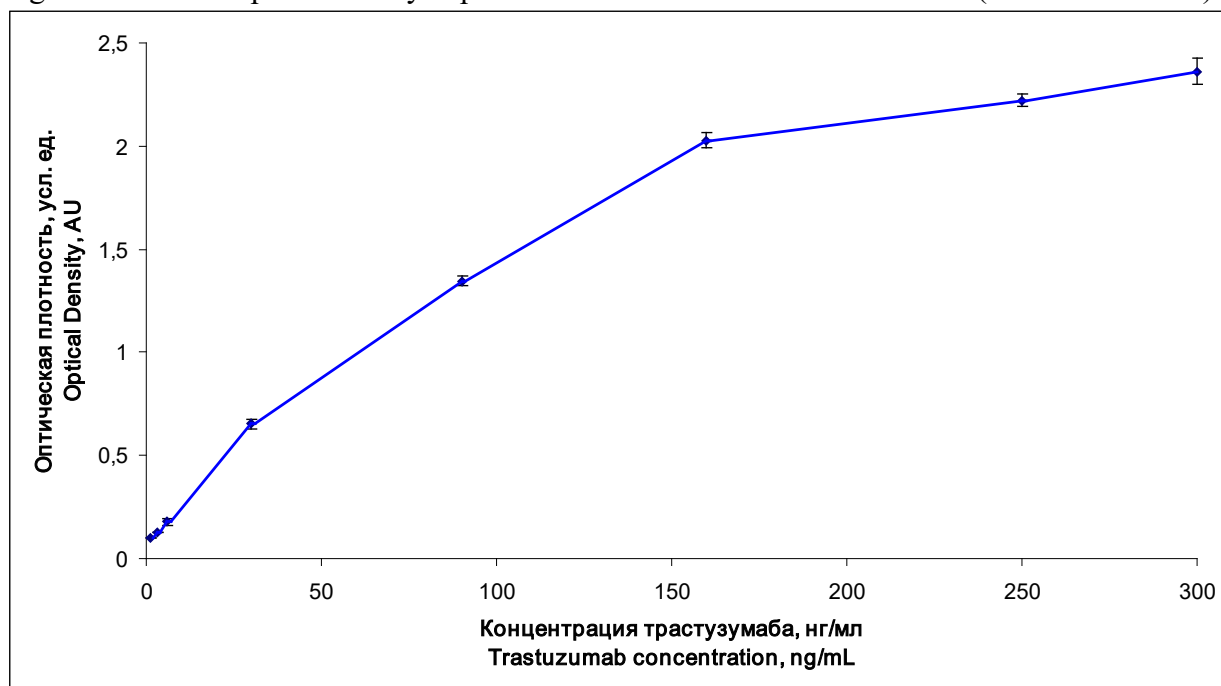
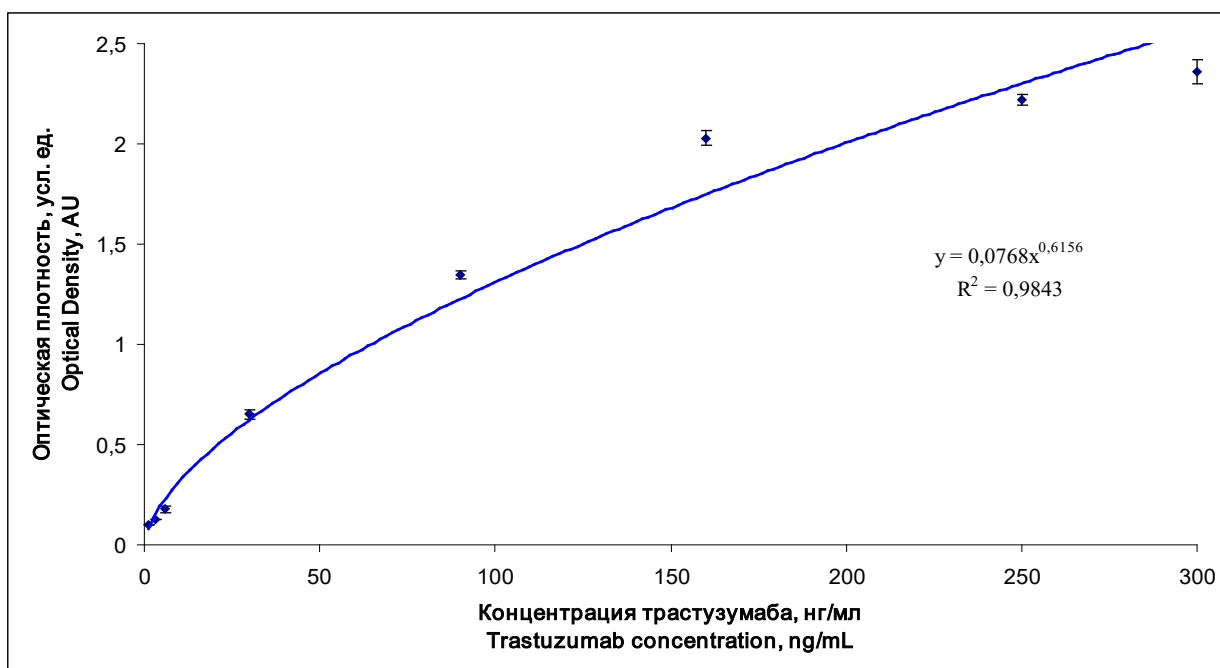


Рисунок 1б. Регрессионная кривая при расчёте концентрации трастузумаба по использованным в создании тест-системы калибраторам в зависимости от полученных показателей оптической плотности.

Figure 1b. Regression curve when calculating the concentration of trastuzumab according to the calibrators used in the test system engineering depending on the optical density values obtained.



Для определения предела определения (ПО) и нижнего предела количественного определения (НПКО) были проанализированы 10 образцов бланковой сыворотки доноров. Полученные значения качественного ПО вычисленные как полученное значение концентрации трастузумаба 0,09 нг/мл плюс три стандартных отклонения составило 0,84 нг/мл. НПКО было определено как 0,09 нг/мл плюс десять стандартных отклонений, что составило 1,41 нг/мл.

При измерениях тест-системы на точность и воспроизводимость были применены образцы сыворотки крови реальных доноров, в которые были добавлены известные концентрации трастузумаба. Всего подобным образом было изготовлено 5 базовых образцов контроля качества на сыворотках доноров с концентрациями трастузумаба 3, 8,5, 150, 225 и 300 нг/мл. При оценке вариаций внутри аналитической серии было проанализировано по 3 повтора для 3 комплектов образцов для контроля качества в сыворотке. Определённые в результате измерений средние значения концентраций трастузумаба не отклонялись от номинальных значений более чем 11,42% во всём диапазоне определяемых концентраций, при этом выявленная внутри- и межсерийная прецизионность тест-системы не превышала 11,31%, общая ошибка метода – 20,0% (Таблица 1). Полученные значения с запасом укладываются в регламентные валидационные требования правильности в  $\pm 20\%$  от номинального значения, прецизионности в 20% и общей ошибки метода в 30% (14). Согласно полученным данным можно сделать вывод, что прецизионность и точность результатов внутри аналитических серий и между сериями при выполнении тестов в одних и тех же стандартных условиях соответствует значениям в установленных пределах, что позволяет использовать данную методику для определения трастузумаба в сыворотке крови.

Таблица 1. Внутри- и межсерийная прецизионность, правильность и общая ошибка методики определения трастузумаба в сыворотке крови доноров.

Table 1. Within-run and between-run precision, accuracy and total error of the method of trastuzumab determination in the donor's blood serum.

Аналитические характеристики Analytical characteristics	Образцы для контроля качества Quality control samples				
	3 нг/мл ng/ml	8,5 нг/мл ng/ml	150 нг/мл ng/ml	225 нг/мл ng/ml	300 нг/мл ng/ml

**Фармакокинетика и Фармакодинамика, 2023, в печати**

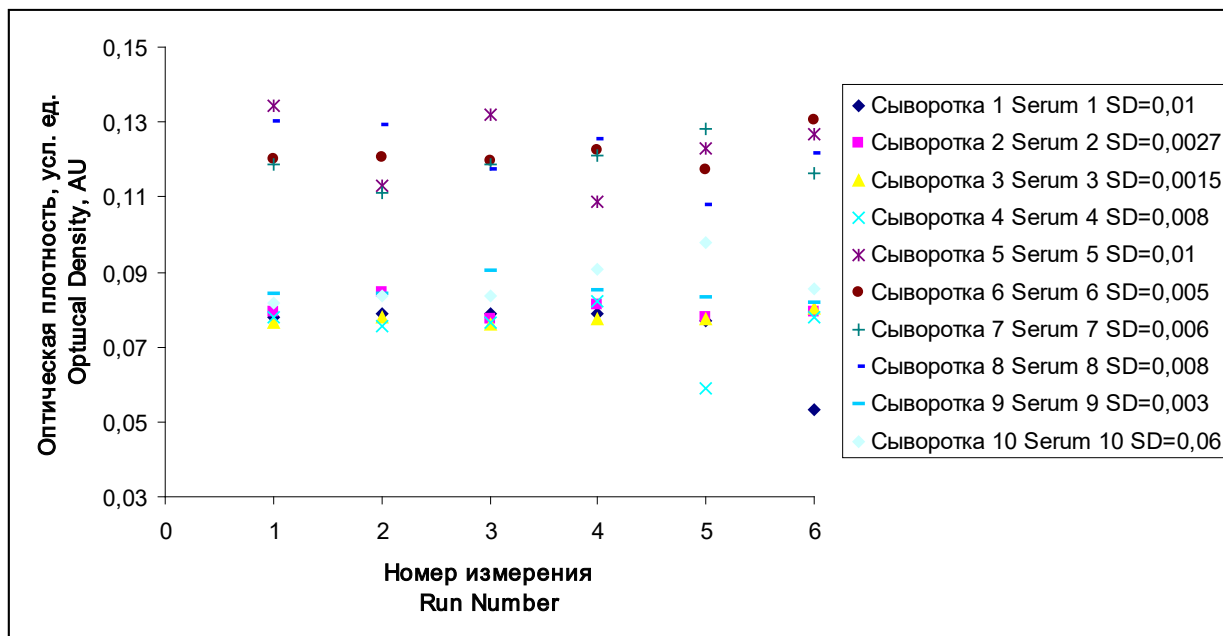
Стандартные измерения внутри аналитической серии (3 образца сыворотки доноров, 3 повтора для каждого образца) Standard tests within analytical run (3 run, each sample in 3 replicates)					
Среднее значение, мкг/мл Mean, .g/mL	2,91	8,26	143,3	199,3	273,6
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, .g/mL	0,14	0,03	8,1	17,1	24
Прецизионность, % Precision, %	4,81	0,36	5,65	8,58	8,77
Правильность, % Accuracy, %	-3,00	-2,82	-4,47	-11,42	-8,80
Общая ошибка, % Total error, %	7,81	3,19	10,12	20,00	17,57
Стандартные измерения между аналитическими сериями (4 серии, 3 повтора для каждого образца) Standard tests between analytical runs (4 runs, each sample in 3 replicates)					
Среднее значение, мкг/мл Mean, .g/mL	3,1	7,9	162,8	211,8	283
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, .g/mL	0,2	0,6	8,2	16,4	32
Прецизионность, % Precision, %	6,45	7,59	5,04	7,74	11,31
Правильность, % Accuracy, %	3,33	-7,06	8,53	-5,87	-5,67
Общая ошибка, % Total error, %	9,78	14,65	13,57	13,61	16,97

При определении селективности была проанализирована способность аналитической методики давать правильный результат определения вещества в присутствии сопутствующих компонентов. В данном разделе изучения влияния матрицы и теста разбавления матрицы было использовано 10 различных источников бланковой сыворотки, в том числе гемолизной. Также было проведено измерение сыворотки с высоким содержанием липидов, полученной путём добавления в бланковую сыворотку 20% интралипида, содержащего 12 г/л фосфолипидов яичного желтка. Всего было проведено 6 идентичных исследований. Результаты представлены на Рисунке 2. При сравнении полученных стандартных отклонений и прецизионности значений полученной оптической плотности, не превышающей 13,8% становится ясно, что тест-система отвечает

валидационным требованиям по селективности, для которой прецизионность не должна превышать 30%.

Рисунок 2. Селективность тест-системы для 10 различных сывороток. SD- стандартное отклонение для каждой сыворотки.

Figure 2. Selectivity of the test system for 10 different sera. SD is the standard deviation for each serum.



Для осуществления тестов на стабильность было проведено три серии экспериментов. Во всех было использовано по 3 образца сыворотки со всеми 5 концентрациями трастузумаба в качестве образцов контроля качества. Для тестов на краткосрочную стабильность образцы сыворотки с трастузумабом экспонировались при 25 °С в течение 6 часов. При проведении теста на длительное хранение образцы были заморожены при -35 °С в течение 50 дней, после чего разморожены и измерены. Влияние замораживания-оттаивания было оценено после трёх циклов заморозки при -35 °С на 12 часов и оттаивания при 25 °С. Результаты представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Влияние краткосрочного хранения, долгосрочного хранения при заморозке и трёх циклов замораживания-оттаивания на стабильность результатов измерения трастузумаба.

Table 2. Effect of short-term storage, long-term freeze storage and three freeze-thaw cycles on the stability of trastuzumab measurements

Аналитические характеристики Analytical characteristics	Образцы для контроля качества Quality control samples				
	3 нг/мл ng/ml	8,5 нг/мл ng/ml	150 нг/мл ng/ml	225 нг/мл ng/ml	300 нг/мл ng/ml
Исходное состояние (3 образца) Initial state (3 samples)					
Среднее значение, мкг/мл Mean, µg/mL	2,87	7,67	149,93	194,63	293,45
Стандартное отклонение, мкг/мл	0,3	0,05	2,34	2,32	6,58

**Фармакокинетика и Фармакодинамика, 2023, в печати**

Standard deviation, µg/mL					
Прецизионность, % Precision, %	10,45	0,65	1,56	1,19	2,24
Правильность, % Accuracy, %	-4,33	-9,76	-0,05	-13,50	-2,18
Краткосрочное хранение 6 часов при 25 °С Short term storage 6 hours at 25°C					
Среднее значение, мкг/мл Mean, µg/mL	3,54	8,11	163	207	280
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, µg/mL	0,17	0,56	8	16	25
Прецизионность, % Precision, %	4,80	6,91	4,91	7,73	8,93
Правильность, % Accuracy, %	18,00	-4,59	8,67	-8,00	-6,67
Длительное хранение при -35 °С в течение 50 дней Long-term storage at -35 °C for 50 days					
Среднее значение, мкг/мл Mean, µg/mL	3,075	7,85	159,6	221,3	269,5
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, µg/mL	0,27	0,53	9,9	28,9	17,2
Прецизионность, % Precision, %	8,78	6,75	6,20	13,06	6,38
Правильность, % Accuracy, %	2,50	-7,65	6,40	-1,64	-10,17
Три цикла замораживания/оттаивания при -35 °С на 12 часов Three freeze/thaw cycles at -35°C for 12 hours					
Среднее значение, мкг/мл Mean, µg/mL	3,46	8,21	157	205	272
Стандартное отклонение, мкг/мл Standard deviation, µg/mL	0,19	0,6	7	18	26
Прецизионность, %	5,49	7,31	4,46	8,78	9,56



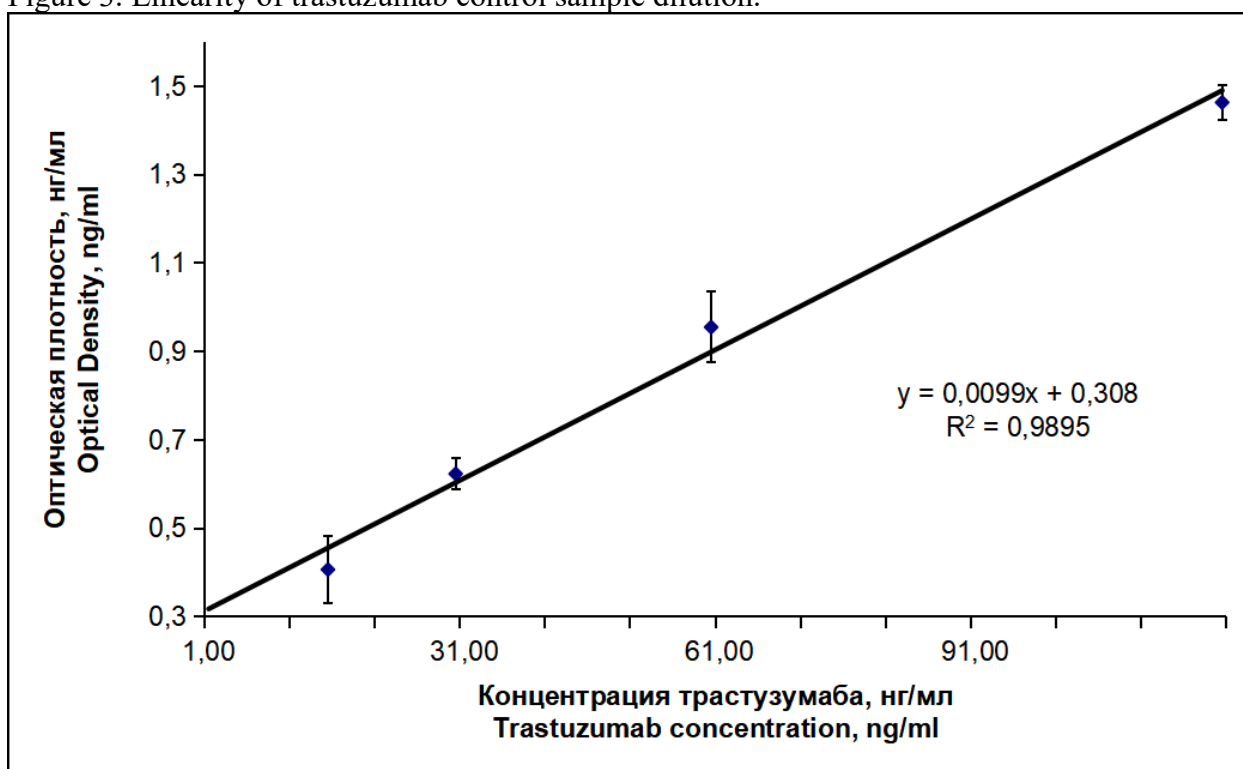
Precision, %					
Правильность, %	15,33	-3,41	4,67	-8,89	-9,33
Accuracy, %					

При осуществлении теста на линейное разбавление было проанализировано разбавление образца для контроля качества концентрацией 600 мкг/мл реакционным буфером в 2, 4 и 8 раз. Затем все полученные растворы были разбавлены бланковой сывороткой в 5000 раз до концентраций 120, 60, 30 и 15 нг/мл и проанализированы в трёх постановках. Результаты представлены на Рисунке 3. Выявленная линейная регрессия представляет функцию

$$(2) \quad y=0,0099x+0,308$$

Величина достоверной аппроксимации  $R^2$  составила 0,9843. При обратном расчёте концентраций калибровочных стандартов отклонения от теоретических значений попали в диапазон от -11,7 до 13,6%, что не превосходит допустимые 20% (13). Обратно рассчитанные по формуле (1) концентрации трастузумаба не отклонялись от номинальных более чем на 13% после пересчёта на разведение, а прецизионность конечных концентраций по всем разведениям не превышала 6%.

Рисунок 3. Линейность разведения контрольного образца трастузумаба.  
Figure 3. Linearity of trastuzumab control sample dilution.



### Выводы

Проведённые валидационные процедуры подтверждают, что представленная методика количественного определения содержания трастузумаба в биологических жидкостях на основе твердофазного иммуноферментного анализа обладает высокой чувствительностью, специфичностью, воспроизводимостью и стабильностью. По всем международным требованиям (14,15) методика, разработанная ООО «Научно-производственный центр Пробиотек» соответствует валидационным параметрам, предъявляемым для

биоаналитических методов. Подтверждённые характеристики тест-системы позволяют использовать её для оценки фармакокинетики трастузумаба, в том числе при проведении персонализированной антираковой терапии пациентов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- 1 Mendes D, Alves C, Afonso N, Cardoso F, Passos-Coelho JL, Costa L, Andrade S, Batel-Marques F. The benefit of HER2-targeted therapies on overall survival of patients with metastatic HER2-positive breast cancer—a systematic review. *Breast Cancer Res.* 2015;17:140. doi: 10.1186/s13058-015-0648-2
2. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: A meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer.* 2007;7:153. doi: 10.1186/1471-2407-7-153
3. Swain SM, Miles D, Kim S-B, Im Y-H, Im S-A, Semiglazov V, Ciruelos E, Schneeweiss A, Loi S, Monturus E et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): End-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2020;21:519–530. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30863-0
4. Eiger D, Agostinetti E, Saúde-Conde R, de Azambuja E. The Exciting New Field of HER2-Low Breast Cancer Treatment. *Cancers (Basel).* 2021;13(5):1015. doi: 10.3390/cancers13051015.
5. Bailey TA, Luan H, Clubb RJ, et al. Mechanisms of Trastuzumab resistance in ErbB2-driven breast cancer and newer opportunities to overcome therapy resistance. *J Carcinog.* 2011;10:28. doi:10.4103/1477-3163.90442
6. Maple L, Lathrop R, Bozich S, Harman W, Tacey R, Kelley M, Danilkovitch-Miagkova A. Development and validation of ELISA for herceptin detection in human serum. *J Immunol Methods.* 2004;295(1-2):169-82. doi: 10.1016/j.jim.2004.09.012.
7. Писарев В.В., Уляшова М.М., Гильдеева Г.Н. Валидация иммуноферментной тест-системы для доклинических исследований фармакокинетики ритуксимаба. // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения* –2019.– 9(2). - 131-139. [Pisarev VV, Ulyashova MM, Gildeeva GN. Validation of Enzyme Immunoassay for Preclinical Pharmacokinetic Trials of Rituximab. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2019;– 9(2). 131-139. (In Russ).]
8. Allinson JL. Clinical biomarker validation. *Bioanalysis.* 2018;10(12):957-968. doi: 10.4155/bio-2018-0061.
9. CPMP/ICH/3812/95. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology. London:June 1995.
10. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. / Под ред. Н. В. Юргеля, А. Л. Младенцева, А. В. Бурдейна, М. А. Гетьмана, А. А. Малина. - Фармацевтическая промышленность. М.: 2007.
11. Митькина ЛИ, Ковалева ЕЛ. Подходы к оценке пригодности аналитических методик при проведении экспертизы качества лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2012;2:6-9. [Mit'kina LI, Kovaleva EL. Approaches to evaluation of analytical methods suitability when performing medicines quality evaluation. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2012; 2:131-139. (In Russ).]
12. Tsurusawa N, Chang J, Namba M, Makioka D, Yamura S, Iha K, Kyosei Y, Watabe S, Yoshimura T, Ito E. Modified ELISA for Ultrasensitive Diagnosis. *J Clin Med.* 2021;10(21):5197. doi: 10.3390/jcm10215197.
13. Crowther JR. The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol.* 2000;149:III-IV, 1-413. doi: 10.1385/1592590497.

14. Guidance for Industry Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. 2014. Available from:  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM338856.pdf>.
15. Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, Fiscella M, Gorovits B, Kirschner S, Moxness M, Parish T, Quarmby V, Smith H, Smith W, Zuckerman LA, Koren E. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;48(5):1267–81. doi: 10.1016/j.jpba.2008.09.020.