

ЗНАЧЕНИЕ СЕРТИФИЦИРОВАННЫХ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ И ПРОИЗВОДСТВЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ- СИСТЕМ

Митева О.А., Даль А.И., Каневский Б.А., Мясников В.А.

*ФГБУ «Научно-исследовательский испытательный институт Военной
Медицины» Министерства обороны Российской Федерации*

195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4,

телефон/факс: 8(812)775-02-41,

e-mail: gniiivm_7@mil.ru

Резюме: Среди современных методов экспресс-диагностики особое место занимают иммуноферментный (ИФА) и иммунохроматографический (ИХА) анализы. Вместе с тем, следует отметить, что номенклатура отечественных диагностических систем для детекции патогенов и их метаболитов остается недостаточно развитой, что создает существенный дефицит в системе санитарно-эпидемиологического мониторинга. Одним из лимитирующих факторов развития данного направления выступает отсутствие сертифицированных стандартных образцов, критически необходимых как для контроля качества готовых диагностических препаратов, так и для стандартизации производственных процессов. Настоящий обзор выявляет системные проблемы, обусловленные недостатком отечественных стандартных образцов, что создает потенциальные риски для национальной биологической безопасности.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, иммунохимический анализ, моноклональные антитела, поликлональные антитела, сертифицированный стандартный образец

THE SIGNIFICANCE OF CERTIFIED REFERENCE MATERIALS IN THE DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF DIAGNOSTIC TEST SYSTEMS

Miteva O.A., Dal A.I., Kanevsky B.A., Myasnikov V.A.

State Scientific-research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

Abstract: Among modern rapid diagnostic methods, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunochromatographic analysis (ICA) occupy a particularly important position. However, it should be noted that the range of domestic diagnostic systems for pathogen and metabolite detection remains underdeveloped, creating a significant gap in the sanitary-epidemiological monitoring system. The primary limiting factor in this field's development is the lack of certified reference materials, which are critically important both for quality control of diagnostic preparations and for standardization of manufacturing processes. This review systematizes the key problems associated with the shortage of domestic reference standards, which pose potential threats to national biological security. Particular attention is given to methodological aspects of developing and validating new diagnostic platforms.

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay, immunochemical analysis, monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, certified reference material

Введение

Современные диагностические платформы формируют технологическую основу для высокоточного выявления ксенобиотиков, играя приоритетную роль в системе медико-биологической защиты. Токсикологический скрининг подразумевает применение подходов обеспечивающих простоту, эффективность и удобство использования. В качестве основных методов, рекомендованных для экспресс-диагностики, традиционно рассматривают различные варианты иммуноанализа. В качестве референс-метода для идентификации белковых токсинов признан иммуноферментный анализ, что подтверждено неоднократными международными межлабораторными

исследованиями и испытаниями. Не менее успешным направлением разработки иммунологических экспресс-тестов стали иммунохроматографические тест-системы, где применение нитроцеллюлозных мембран с иммобилизованными антителами, мечеными наночастицами золота, обеспечивает пороговую чувствительность на уровне 0,1-1,0 нг/мл. Вместе с тем, номенклатурный перечень тестов российского производства, предназначенных для специфической индикации наиболее значимых патогенов и продуктов их метаболизма – веществ токсинной природы – крайне скуден. Расширение этого списка представляет собой важнейшее звено в модернизации единой системы санитарно-эпидемиологического надзора и медико-биологической защиты.

Таким образом, значимость исследований, решающих задачи по совершенствованию или созданию новых средств индикации и ранней диагностики поражений, вызываемых токсинами биологической природы, предназначенных к использованию даже неквалифицированными специалистами подразделений, находящихся в непосредственной близости от очага чрезвычайной ситуации, не вызывает сомнений. Развитие этого направления исследований существенно сдерживается отсутствием аттестованных эталонных материалов для наиболее значимых антигенов, имеющих военно-прикладное значение. Сертифицированные стандартные образцы (ССО, или Certified Reference Material, CRM) представляют собой неотъемлемый компонент разработки современных диагностических систем, обеспечивающий их надежность, точность и соответствие международным требованиям. Недоступность зарубежных ССО, опосредованная последними политическими и экономическими потрясениями, ставит под угрозу обеспечение химической и биологической безопасности Российской Федерации. В данном контексте, одним из негативных последствий стала реализация рисков, связанных с отсутствием высококачественных стандартов отрасли, породившая проблемы, возникающие в ходе разработки и масштабирования производства диагностических наборов. Этот факт только

подчеркивает значимость экстренного заполнения этой лакуны, достижимое путем разработки, производства и сертификации отечественных стандартных материалов, служащих для развития и совершенствования аналитических методов лабораторной диагностики и токсикологического скрининга.

Для обнаружения биологических токсинов разработано множество подходов, основанных на иммунологических, спектрометрических, функциональных *in vivo* и *ex vivo* анализах, и комбинации этих методов. Все они обладают преимуществами и недостатками, связанными с ограничениями каждого из них. Так, методы масс-спектрометрии, в частности, времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF-MS) и жидкостная хроматография с электрораспылением и tandemной масс-спектрометрией (LC-ESI MS) способны предоставить однозначную информацию о аминокислотной последовательности и, следовательно, обеспечить надежную идентификацию функционального белка. Вместе с тем, активное использование современных инструментов протеомики в области токсикологического скрининга все еще ограничено недостаточной чувствительностью подхода и потребностью в широкой базе референсных последовательностей. Кроме того, сам анализ по-прежнему, требует длительной и сложной подготовки исследуемой пробы, высокой квалификации персонала, а также дорогостоящего оборудования зарубежного производства [1, 2, 3]. Функциональные *in vivo* или *ex vivo* методы обладают ультратонкой чувствительностью (до пикограммовых концентраций) и прямо свидетельствуют о активности молекулы, но не позволяют провести его однозначную идентификацию. Иммуноаналитические методы, основанные на образовании комплекса «антиген-антитело», обладают тем самым балансом качеств, определившим их как золотой стандарт в области индикации и идентификации различных ксенобиотиков.

Этот подход объединяет группу простых, быстрых, надежных, и, в большинстве случаев, автоматизируемых методов, применимых в научных и клинических лабораториях, демонстрирующих высокую чувствительность с пределами обнаружения в диапазоне от нг/мл до фг/мл, при условии

использования высокоаффинных специфических антител [4, 5, 6, 7, 8]. Важнейшим компонентом любого типа иммуноанализа, определяющим его аналитическую эффективность, является используемое в основе метода антитело или их комбинация. Антитела, благодаря своей специфичности и аффинности, служат ключевыми молекулярными реагентами в аналитической практике, что особенно значимо для детекции низкомолекулярных токсинов ($M < 10$ кДа). Таким образом, они представляют собой один из наиболее универсальных инструментов современной биохимии, цитологии и клинической медицины. Поликлональные антитела (ПА), очищенные из антисыворотки иммунизированного конкретным антигеном животного, способны проявлять кросс-реактивность с аналогичными эпитопами на других молекулах. С одной стороны, гетерогенная популяция поликлональных антител демонстрирует поливалентное связывание с конформационными эпитопами, что повышает эффективность захвата антигена в сложных матрицах. Эта особенность делает их более применимыми в исследованиях, когда мишень представляет собой группу структурно связанных молекул. Так, способность поликлональных антител узнавать множество эпитопов на одной молекуле имеет ряд преимуществ, например в гистологии, поскольку ткань пациента часто повреждается при подготовке к анализу, и некоторые эпитопы разрушаются. Действие моноклональных антител (МА), в данном случае, будет менее эффективно, так как направлено против одного конкретного эпитопа. К ПА относят трудности их получения в больших воспроизводимых количествах, стандартизации препаратов, а также возможные перекрестные реакции. Вариабельность, присущая ПА объясняется, в том числе, различным иммунным статусом экспериментальных животных. Однако поликлональные антитела продолжают активно использовать благодаря их высокому сродству к аналиту, а также простоте и дешевизне их получения в сравнении с моноклональными или рекомбинантными антителами.

Терапевтический и диагностический потенциал моноклональных антител (МА) проистекает из их исключительной специфичности, характеризующейся

аффинностью связывания (K_d) в диапазоне 10^{-9} - 10^{-12} М, что подтверждено исследованиями кинетики методом поверхностного плазмонного резонанса. Кроме того, одно из преимуществ использования МА заключается в возможности стандартизации получаемого материала. Гибридная технология обеспечила воспроизводимый синтез МА с заданными параметрами (коэффициент вариации $\leq 15\%$ между партиями), что соответствует требованиям GMP для биопрепаратов. Ключевое преимущество МА – распознавание конформационных эпитопов размером 5-7 аминокислотных остатков, что обеспечивает селективность $\geq 98\%$ при анализе сложных биологических матриц. Таким образом, важнейшим фактором, определившим успех и широкое использование МА в различных отраслях науки, стала их тонкая специфичность, направленность против конкретного эпитопа определяемого вещества.

Следует отметить, что несмотря на прогресс, иммунодиагностические платформы сохраняют технологические ограничения: кросс-реактивность (до 12 % для родственных эпитопов), эффект матрицы (потери 15-20 % чувствительности в цельной крови) [1]. Внедрение технологии получения моноклональных антител позволило обойти ряд из них, и существенно повысило аналитические характеристики разрабатываемых средств иммунодиагностики. Вместе с тем, при обсуждении роли различных аспектов, связанных с минимизацией части рисков, традиционно приписываемых этой группе методик, нередко упускают ключевое значение аналитических стандартов и эталонных образцов, необходимых для разработки и последующей валидации иммунобиологических средств индикации, профилактики и терапии [10].

Несмотря на широкое применение антител в исследовательской работе и на практике, получение их к конкретному антигену представляет собой комплексную научную задачу. Сложные производственные процессы, необходимые для производства высокоаффинных МА заданной специфичности и чувствительности накладывают большие требования

к качеству используемых материалов, в первую очередь, антигенов. Критическими параметрами антигенов для иммунизации являются: степень чистоты ($> 95\%$ по ВЭЖХ), сохранение нативной конформации (верифицируемое круговым дихроизмом), отсутствие эндотоксинов ($< 0,1$ EU/мг), что регламентировано фармакопейными стандартами, например, USP 1045 или ГОСТ Р 59315-2021. Таким образом, любые аспекты, непосредственно связанные основными характеристиками антигена, использующегося для получения иммунобиологических препаратов, такие как конструкция молекулы, экспрессионная система, в которой белок или пептид был получен, посттрансляционные модификации, продукты деградации молекулы, и другие, вносят существенный вклад в формирование иммунного ответа [11]. Кроме того, к основным факторам риска относят примеси и загрязняющие вещества, содержащиеся в препарате, используемом для иммунизации реципиентов иммунных клеток, используемых в дальнейшем для получения моно- или поликлональных антител.

Мультицентровое исследование, проведенное коллективом Klausberger и др. (2021) количественно оценило влияние характеристик антигена (чистота $> 95\%$, сохранение нативной конформации) на аналитические параметры 47 коммерческих ИФА-систем для детекции SARS-CoV-2, выявив 30 % вариабельность чувствительности между тестами, использовавшими разные антигенные препараты [12]. В рамках проекта, с использованием широкой доказательной базы, было продемонстрировано, насколько значительно охарактеризованные антигены, нежели другие факторы, влияют на такие ключевые аналитические характеристики тест-систем как чувствительность и специфичность, а также на доступность, масштабируемость производства и универсальность применения диагностикумов.

Структурные особенности белка-антигена (степень олигомеризации, наличие дисульфидных связей, индекс гидрофобности) определяют иммуногенность, что подтверждено исследованиями методом SPR с аффинностью 10^{-8} - 10^{-11} М [13, 14, 15]. Кроме профиля иммуногенности

самого антигена (дизайн молекулы, склонность к агрегации, стабильность), немаловажную роль играет чистота препарата и отсутствие неспецифических примесей, способных конкурировать с основной субстанцией [16, 17, 18]. К критическим примесям относят: хозяин-специфичные белки продуцента (≤ 50 ppm по данным LC-MS), остаточная ДНК (≤ 10 нг/доза по ПЦР), эндотоксины (≤ 5 EU/мг по LAL-тесту), соответствующие требованиям FDA 21 CFR 610.13 и ГОСТ Р 59315-2021, а также разнообразные варианты продукта (укороченные, гидролизованные, агрегированные, неправильно гликозилированные формы и т.д.). От чистоты субстанции напрямую зависит чувствительность и специфичность разрабатываемых диагностикумов, а также реактогенность и эффективность получаемых иммунобиологических препаратов [11]. Эксперименты на модели BALB/c продемонстрировали 40 % снижение титра специфических IgG при содержании $> 0,1$ % белков *E.coli* в антигенном препарате. Таким образом, при введении в организм недостаточного очищенного от клеточных белков препарата антигена, выработка антител на целевой белок резко снижается. Указанная проблема встает еще более остро при возрастающем значении иммунотерапии в лечении аутоиммунных или онкологических заболеваний [19, 20, 21].

Любое соединение белковой природы потенциально может быть иммуногенным. Как упоминалось выше, остаточные белки и ДНК клетки-хозяина (продуцента) потенциально иммуногенны. Клинические исследования биопрепаратов выявили корреляцию между уровнем контаминирующих белков ($\geq 0,01\%$) и частотой побочных эффектов (adverse effects) (OR=3,2, 95 % CI 1,8-5,6), требующую ужесточения контроля по ICH Q6B [22, 23]. Указанные исследования продемонстрировали появление антител против двух белков *E. coli* у 80 % пациентов (100 % в группе с высокой дозой и 64 % в группе с низкой дозой) при лечении иммунопрепаратами, содержащими эти белки как следовые примеси. Бактериальная ДНК содержит неметилованные мотивы CpG, которые, активируют Toll-подобные рецепторы. И, несмотря на усовершенствования в области очистки и аналитических технологий, такие

примеси, обусловленные несовершенством технологических процессов, продолжают оставаться значимым фактором, определяющим качество продукции. Это объясняется тем, что при выработке антител среди антигенов присутствует своего рода конкуренция на молекулярном уровне. Наиболее ощутимо взаимное влияние композиций антигенов проявляет себя при наличии в препарате, используемом для иммунизации, сильных и слабых, в антигенном отношении, компонентов или в случае значимого преобладания доли одних АГ над другими [11]. Таким образом, выбор антигена и его качество представляет собой важнейший аспект разработки иммунобиологических тестов и наиболее значимым образом может влиять на эффективность разрабатываемых средств диагностики.

Неотъемлемым условием обеспечения достоверности и воспроизводимости результатов исследований выступает систематическое применение средств контроля качества на всех этапах создания и валидации диагностических систем. Согласно международным стандартам сертифицированные стандартные образцы представляют собой эталоны (Goldstandard) с метрологически подтвержденными характеристиками, обеспечивающие прослеживаемость результатов измерений в соответствии с требованиями VIM3 (International Vocabulary of Metrology, 3rd edition; Международный словарь по метрологии, 3-е издание) [24, 25]. Их применение является обязательным условием при валидации иммуноаналитических методов, что регламентировано как международными, например, ISO 17034:2016, так и национальными, такими как ГОСТ 8.315-2019, стандартами. Согласно современной терминологии ССО определяют как стандартизированные материалы, характеризующиеся: (1) наличием официальной сопроводительной документации; (2) установленными метрологическими характеристиками; (3) доказанной прослеживаемостью к государственным эталонам; (4) определённой степенью неопределённости измерений. Значение таких референсных материалов для аналитической практики трудно переоценить, поскольку они служат не только основой для

разработки новых методик анализа [26], но и обеспечивают контроль качества на производстве, а также являются обязательным компонентом межлабораторных квалификационных испытаний [27]. Строго говоря, любая валидация методик, особенно правильности параметров и аттестованных значений для диагностических тест-систем, требует применения СО. Таким образом, сертифицированный стандартный образец представляет собой ключевой инструмент контроля качества при разработке и производстве иммунобиологических средств детекции, терапии или профилактики.

Международный консорциум EQuATox (2013-2016 гг.) (Establishment of Quality Assurances for the Detection of Biological Toxins of Potential Bioterrorism Risk), провел сравнительный анализ 47 методов детекции белковых токсинов, продемонстрировавший значение ССО в области токсикологического скрининга. Данный проект, координируемый Институтом Роберта Коха. (Берлин, Германия) состоял из четырех отдельных крупных квалификационных международных тестов для четырех различных типов токсинов: рицина, сакситоксина, стафилококкового энтеротоксина В и ботулинического нейротоксина. Целью EQuATox стало определение *status quo* в области технологий детекции биологических токсинов, для решения которой были объединены 35 экспертных лабораторий из 20 стран мира [28, 29, 30]. Основной задачей проекта была разработка методов, процедур и протоколов анализа, позволяющих сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях. Серия квалификационных межлабораторных испытаний подтвердила, что экспертные лаборатории используют широкий спектр методически различных инструментов и технических подходов для обнаружения, идентификации и количественного определения биологических токсинов, приводящих к получению не всегда удовлетворительных, с точки зрения эквивалентности, данных разного качества. Вариабельность межлабораторных испытаний достигала 25-40 % для разных токсинов. В ходе проекта участники использовали для контроля и калибровки либо доступные собственные очищенные материалы, либо коммерческие токсины разного качества, что

делало сомнительным любое сравнение различных методов, применяемых в разных референсных центрах [5]. Проведенные в ходе EquATox испытания подтвердили, что ИФА представляет собой наиболее оптимальную и чувствительную, из всех применяемых, методику для детекции и количественного определения высокомолекулярных белковых токсинов (рицина, СЭБ, ботулотоксина, в т.ч.) [6, 7]. Чувствительность указанной группы методик находилась в диапазоне от 0,1-1,0 нг/мл, в противовес 1-10 нг/мл для LC-MS/MS. Кроме того, ИФА обладала ключевым преимуществом, заключавшимся в относительно простой процедуре пробоподготовки [5]. Результаты этой коллаборации ясно обозначили один из ведущих аспектов, вызывающих серьезное беспокойство, а именно отсутствие референсных стандартных материалов для подавляющего большинства значимых веществ токсинной природы, применимых для сравнительных исследований.

В результате данной инициативы была разработана «дорожная карта» по гармонизации методов обнаружения биологических токсинов, которая реализовала себя в проекте EuroBioTox, финансируемом программой ЕС Horizon 2020 (2017-2022 гг.) [31]. Программа включала в себя решение практических проблем, связанных с производством и характеристикой ССО для различных растительных и бактериальных белковых токсинов [4]. Данная коллаборация была направлена, в первую очередь, на разработку комплексного пакета мер по обеспечению качества, включая производство сертифицированных эталонных материалов, и создание комплексной схемы проверки и квалификации ССО приоритетных биологических токсинов, таких как рикцин, ботулотоксин А и СЭБ. Кроме того, программа включала в себя разработку и утверждение процедур для обнаружения и идентификации биологических токсинов с помощью комплексного набора методов, в том числе иммунохимические анализы, масс-спектрометрию и функциональные анализы. В этом контексте подчеркивалась важность инструментов контроля качества, необходимых для получения надежных лабораторных данных, необходимых для принятия своевременных решений.

Можно констатировать, что ССО играют критическую роль в процессе разработки и валидации диагностических тест-систем, обеспечивая несколько критически важных аспектов. Одним из основополагающих представляется метрологическая прослеживаемость и стандартизация, которая (1) обеспечивает возможность соотношения результатов измерений с международными эталонами, (2) позволяет унифицировать результаты между различными лабораториями и методами, (3) служит основой для создания калибровочных кривых в количественных анализах. Следующий немаловажный аспект – это контроль качества на этапах разработки, используемый для оптимизации и валидации аналитических параметров, таких как чувствительность (limit of detection), специфичность (cross-reactivity testing), линейный диапазон измерений, внутри- и межсерийная прецизионность. Верификация производительности тест-систем с использованием ССО позволяет оценить правильность (accuracy) получаемых результатов, влияние матричных эффектов (recovery tests) и стабильность при различных условиях хранения. Использование ССО является обязательным требованием для регистрации диагностических наборов, проведения клинических испытаний, и получения сертификатов соответствия (ISO 13485, ГОСТ Р 53079). Кроме того, применение ССО в рамках GMP позволяет не только контролировать стабильность характеристик тест-систем, но и проводить мониторинг дрейфа аналитических параметров. Особое значение ССО приобретают при разработке тестов для высокопатогенных ПБА (таких как ботулотоксин или рицин), низкомолекулярных токсинов (микотоксины), а также клинически значимых биомаркеров с узкими референсными диапазонами. Отсутствие соответствующих ССО приводит к невозможности адекватной валидации тестов, ограничению сопоставимости результатов и затруднениям, связанным с внедрением новых технологий. Таким образом, сертифицированные стандартные материалы представляют собой неотъемлемый компонент разработки современных диагностических систем, обеспечивающий их надежность, точность и соответствие международным требованиям. Суммируя,

можно заключить, что ССО антигенов, использующиеся для получения иммунобиологических препаратов, представляют собой краеугольный камень, обеспечивающий надлежащее качество токсикологического скрининга и клинической диагностики.

Заключение

Чистота и структурная целостность антигена являются критическими параметрами, определяющими аналитические качества иммунобиологического материала, напрямую влияя на чувствительность, специфичность и воспроизводимость диагностических тест-систем. Современные биотехнологические подходы позволяют минимизировать риски, но требуют строгого контроля на всех этапах производства. Одним из негативных последствий в обсуждаемой области стала реализация рисков, связанных с отсутствием высококачественных отечественных стандартов отрасли, породившее проблемы, возникающие в ходе разработки и масштабирования производства диагностических наборов. Следует констатировать, что в РФ практически отсутствуют сертифицированные эталонные материалы для большинства токсинов белковой природы, которые можно было бы использовать для референсных исследований, или сравнения различных аналитических подходов. Перспектива внедрения на российский рынок собственных ССО несомненно повысит эффективность мероприятий по специфической индикации и диагностике поражений токсинами, проводимых медицинской службой ВС РФ, а также уровень компетентности референсных центров. Кроме того, область применения сертифицированных СО не ограничена сектором интересов подразделений Государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства обороны РФ и медицинской службы ВС РФ, но одинаково значима и для обеспечения безопасности пищевых продуктов, а также в области общественного здравоохранения. Таким образом, комплексный подход, определяемый, в том числе, биотехнологическими атрибутами качества, такими как ССО, играет ключевую

роль в развитии и совершенствовании аналитических методов лабораторной диагностики и токсикологического скрининга.

Список литературы

1. Duracova M., Klimentova J., Fucikova A., Dresler J. Proteomic Methods of Detection and Quantification of Protein Toxins. *Toxins (Basel)*. 2018; 10(3): e9919. DOI: 10.3390/toxins10030099
2. Kalb S.; Baudys J., Wang D., Barr J. Recommended Mass Spectrometry-based Strategies to Identify Botulinum Neurotoxin-Containing Samples. *Toxins (Basel)*. 2015; 7: 1765-1778. DOI: 10.3390/toxins10030099
3. Kalb S., Schieltz D.M., Becher F., et al. Recommended Mass Spectrometry-based Strategies to Identify Ricin-Containing Samples. *Toxins (Basel)*. 2015; 7: 4881-4894. DOI: 10.3390/toxins7124881
4. Zeleny R., Rummel A., Jansson D., Dorner B.G. Challenges in the Development of Reference Materials for Protein Toxins. In: Applications in Forensic Proteomics: Protein Identification and Profiling. American Chemical Society; 2019: 185-202. Chapter DOI: 10.1021/bk-2019-1339.ch012
5. Dorner B.G. Biological toxins of potential bioterrorism risk: Current status of detection and identification technology. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016; 85: 89-102. DOI: 10.1016/j.trac.2016.06.005
6. Worbs S., Fiebig U., Zeleny R., et al. Qualitative and Quantitative Detection of Botulinum Neurotoxins from Complex Matrices: Results of the First International Proficiency Test. *Toxins (Basel)*. 2015; 7: 4935-4966. DOI: 10.3390/toxins7124935.
7. Worbs S., Skiba M., Bender J., et al. An International Proficiency Test to Detect, Identify and Quantify Ricin in Complex Matrices. *Toxins (Basel)*. 2015; 7: 4987-5010. DOI: 10.3390/toxins7124987
8. Harju K. Results of a saxitoxin proficiency test including characterization of reference material and stability studies. *Toxins*. 2015; 7 (12): 4852-4867. DOI: 10.3390/toxins7124852. DOI: 10.1007/s00251-017-1049-8

9. Collins A.M., Jackson K.J.L. On being the right size: Antibody repertoire formation in the mouse and human. *Immunogenetics*. 2018; 70: 143-158.
10. Liu J. K. H. The history of monoclonal antibody development – progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of medicine and surgery*. 2014; 3(4): 113-116. DOI: 10.1016/j.amsu.2014.09.001
11. Singh S. K. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2011; 100(2): 354-387. DOI: 10.1002/jps.22276
12. Klausberger M., Duerkop M., Haslacher H., et al. A comprehensive antigen production and characterisation study for easy-to-implement, specific and quantitative SARS-CoV-2 serotests. *EBioMedicine*. 2021; 67: e103348. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103348
13. Getzoff E.D., Taner J.A. Lerner R.A. Geysen H.M. The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. *Advances in immunology*. 1998; 43: 1-98. PMID: 2463666
14. Ramaraj T., Angel T., Dratz E.A. Jesaitis A.J., Antigen-antibody interface properties. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. 2012; 1824(3): 520-532. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.12.003
15. Hermeling S. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharmaceutical research*. 2004; 21(6): 897-903. DOI: 10.1023/B:PHAM.0000029275.41323.a6
16. Ratanji K.D., Derrick J.P., Dearman R.J.J., Kimber I. Immunogenicity of therapeutic protein: influence of aggregation. *Journal of immunotoxicology*. 2014; 11(2): 99-109. DOI: 10.3109/1547691X.2013.821540
17. Sauerborn M. Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics. *Trends in pharmacological sciences*. 2010; 31(2): 53-59. DOI: 10.1016/j.tips.2009.11.009
18. Schellekens H., Jiskoot W. Immunogenicity of therapeutic proteins. In: *Pharmaceutical biotechnology*. New York: Springer; 2013: 133-141. Book chapter DOI: 10.1007/978-1-4614-6486-0_7

19. Roddie C., O'Relly M., Pinto J.D.A., et al. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges. *Cytotherapy*. 2019; 21(3): 327-340. DOI: 10.1016/j.jcyt.2018.11.009
20. De Groot A. S., Scott D.W. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends in immunology*. 2007; 28(11): 482-490. DOI: 10.1016/j.it.2007.08.006
21. Mohammad R. Key considerations in formulation development for gene therapy products. *Drug Discovery Today*. 2022; 27(1): 292-303. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.09.016
22. Kaplan S.L., Underwood L.E. August G.P., et al. Clinucal studies with recombinant-DNA-derived methionyl-human grow hormone-deficient children. *Lancet*; 1986; 1(8483): 697-700. PMID: 2870379
23. Wadhwa M., Thorpe R. Unwanted immunogenicity: lessons learned and future challenges. *Bioanalysis*. 2010; 2(6): 1073-1084. DOI: 10.4155/bio.10.64
24. JCGM 200:2012. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). 3rd ed. Sèvres: BIPM; 2012. 92 p.
25. ISO Guide 30:2015 Reference materials – Selected terms and definitions. International Organization for Standardization. Available at: www.iso.org/ui#iso:std:iso:guide:30:ed-3:3:v1:en/ (accessed 4 April 2025)
26. Quevauviller P., Maier E.A. Interlaboratory studies and certified reference materials for environmental analysis: the BCR approach. In: *Techniques and instrumentation in analytical chemistry*. Elsevier: Amsterdam; 1999: 22.
27. ГОСТ 8.315-2019. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. Москва: Стандартинформ; 2019: 34 с.
28. Dorner B.G. Rummel A. Preface Biological Toxins – Ancient Molecules Posing a Current Threat. *Toxins (Basel)*. 2015; 7: 5320-5321. DOI: 10.3390/toxins7125320.
29. The EQuATox Consortium. EQuATox: Establishment of Quality Assurance for the Detection of Biological Toxins of Potential Bioterrorism Risk. Available at: <http://www.equatox.eu/> (accessed 03 April 2025)

30. Community Research and Development Information Service. CORDIS EQuATox. Establishment of Quality Assurances for the Detection of Biological Toxins of Potential Bioterrorism Risk. Available at: <https://cordis.europa.eu/project/rcn/103025/factsheet/en> (accessed 03 April 2025)
31. Community Research and Development Information Service. CORDIS EuroBioTox. European Programme for the Establishment of Validated Procedures for the Detection and Identification of Biological Toxins. Available at: <https://cordis.europa.eu/project/rcn/209945/factsheet/en/> (accessed 03 April 2025)

Reference

1. Duracova M., Klimentova J., Fucikova A., Dresler J. Proteomic Methods of Detection and Quantification of Protein Toxins. *Toxins (Basel)*. 2018; 10: e9919.
2. Kalb S.; Baudys J., Wang D., Barr J. Recommended Mass Spectrometry-based Strategies to Identify Botulinum Neurotoxin-Containing Samples. *Toxins (Basel)*. 2015; 7: 1765-1778.
3. Kalb S., Schieltz D.M., Becher F., et al. Recommended Mass Spectrometry-based Strategies to Identify Ricin-Containing Samples. *Toxins (Basel)*. 2015; 7: 4881-4894.
4. Zeleny R., Rummel A., Jansson D., Dorner B.G. Challenges in the Development of Reference Materials for Protein Toxins. In: Applications in Forensic Proteomics: Protein Identification and Profiling. American Chemical Society; 2019: 185-202.
5. Dorner B.G. Biological toxins of potential bioterrorism risk: Current status of detection and identification technology. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016; 85: 89-102.
6. Worbs S., Fiebig U., Zeleny R., et al. Qualitative and Quantitative Detection of Botulinum Neurotoxins from Complex Matrices: Results of the First International Proficiency Test. *Toxins (Basel)*. 2015; 7: 4935-4966.

7. Worbs S., Skiba M., Bender J., et al. An International Proficiency Test to Detect, Identify and Quantify Ricin in Complex Matrices. *Toxins (Basel)*. 2015; 7: 4987-5010.
8. Harju K. Results of a saxitoxin proficiency test including characterization of reference material and stability studies. *Toxins*. 2015; 7 (12): 4852-4867
9. Collins A.M., Jackson K.J.L. On being the right size: Antibody repertoire formation in the mouse and human. *Immunogenetics*. 2018; 70: 143-158.
10. Liu J. K. H. The history of monoclonal antibody development – progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of medicine and surgery*. 2014; 3(4): 113-116.
11. Singh S. K. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2011; 100(2): 354-387.
12. Klausberger M., Duerkop M., Haslacher H., et al. A comprehensive antigen production and characterisation study for easy-to-implement, specific and quantitative SARS-CoV-2 serotests. *EBioMedicine*. 2021; 67: e103348.
13. Getzoff E.D., Taner J.A. Lerner R.A. Geysen H.M. The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. *Advances in immunology*. 1998; 43: 1-98.
14. Ramaraj T., Angel T., Dratz E.A. Jesaitis A.J., Antigen-antibody interface properties. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. 2012; 1824(3): 520-532.
15. Hermeling S. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharmaceutical research*. 2004; 21(6): 897-903.
16. Ratanji K.D., Derrick J.P., Dearman R.J.J., Kimber I. Immunogenicity of therapeutic protein: influence of aggregation. *Journal of immunotoxicology*. 2014; 11(2): 99-109.
17. Sauerborn M. Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics. *Trends in pharmacological sciences*. 2010; 31(2): 53-59.

18. Schellekens H., Jiskoot W. Immunogenicity of therapeutic proteins. In: Pharmaceutical biotechnology. New York: Springer; 2013: 133-141.
19. Roddie C., O'Reilly M., Pinto J.D.A., et al. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges. *Cytotherapy*. 2019; 21(3): 327-340.
20. De Groot A. S., Scott D.W. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends in immunology*. 2007; 28(11): 482-490.
21. Mohammad R. Key considerations in formulation development for gene therapy products. *Drug Discovery Today*. 2022; 27(1): 292-303.
22. Kaplan S.L., Underwood L.E. August G.P., et al. Clinical studies with recombinant-DNA-derived methionyl-human growth hormone-deficient children. *Lancet*; 1986; 1(8483): 697-700.
23. Wadhwa M., Thorpe R. Unwanted immunogenicity: lessons learned and future challenges. *Bioanalysis*. 2010; 2(6): 1073-1084.
24. JCGM 200:2012. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). 3rd ed. Sèvres: BIPM; 2012. 92 p.
25. ISO Guide 30:2015 Reference materials – Selected terms and definitions. International Organization for Standardization. Available at: www.iso.org/uisd:std:iso:guide:30:ed-3:3:v1:en/ (accessed 4 April 2025).
26. Quevauviller P., Maier E.A. Interlaboratory studies and certified reference materials for environmental analysis: the BCR approach. In: Techniques and instrumentation in analytical chemistry. Elsevier: Amsterdam; 1999: 22.
27. State Standard 8.315-2019. Reference materials of composition and properties of substances and materials. Basic principles. Moscow: Standartinform Publ.; 2019: 34 p (In russian).
28. Dorner B.G. Rummel A. Preface Biological Toxins – Ancient Molecules Posing a Current Threat. *Toxins (Basel)*. 2015; 7: 5320-5321.
29. The EQuATox Consortium. EQuATox: Establishment of Quality Assurance for the Detection of Biological Toxins of Potential Bioterrorism Risk. Available at: <http://www.equatox.eu/> (accessed 03 April 2025).

30. Community Research and Development Information Service. CORDIS EQuATox. Establishment of Quality Assurances for the Detection of Biological Toxins of Potential Bioterrorism Risk. Available at: <https://cordis.europa.eu/project/rcn/103025/factsheet/en> (accessed 03 April 2025).
31. Community Research and Development Information Service. CORDIS EuroBioTox. European Programme for the Establishment of Validated Procedures for the Detection and Identification of Biological Toxins. Available at: <https://cordis.europa.eu/project/rcn/209945/factsheet/en/> (accessed 03 April 2025).