

Применение метода *AlphaScreen* и *AlphaLisa* в разработке лекарственных препаратов и фармакокинетических исследованиях

Мухаметшина Р. Т., Копейн Д. С., Симонов В. М.

Акционерное Общество "ГЕНЕРИУМ", Владимирская область, Россия

Аннотация. Разработка лекарственных препаратов нуждается в высокотехнологичных, простых и чувствительных методах. Метод *AlphaLisa* является универсальным методом, который подходил бы под перечисленные критерии. Однако анализ работ по фармакокинетике лекарственных препаратов, имеющих отношение к данному методу, демонстрирует незначительное количество фармакокинетических исследований при клинических испытаниях. В данной статье мы раскрываем не только положительные стороны метода *Alpha*, но и его недостатки.

Ключевые слова: *AlphaLisa*; фармакокинетика; лекарственные препараты

Для цитирования:

Мухаметшина Р. Т., Копейн Д. С., Симонов В. М. Применение метода *AlphaScreen* и *AlphaLisa* в разработке лекарственных препаратов и фармакокинетических исследованиях. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2022;(1):44–54. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-44-54>

Поступила: 24 февраля 2022 г. **Принята:** 02 марта 2022 г. **Опубликована:** 30 марта 2022 г.

Application of the *AlphaScreen* and *AlphaLisa* method in drug development and pharmacokinetic studies

Mukhametshina RT, Kopein SD, Simonov VM

Joint Stock Company "GENERIUM", Vladimir region, Russia

Abstract. Drug development requires high-tech, simple, and sensitive methods. *AlphaLisa* method was announced as a universal method that would fit the listed criteria. However, research of other works on the pharmacokinetics of drugs related to this method showed a small number of pharmacokinetic studies in clinical trials. In this review, we focused on not only the positive aspects of the *Alpha* method, but also its disadvantages.

Keywords: *AlphaLisa*; pharmacokinetics; medicinal products

For citations:

Mukhametshina RT, Kopein DS, Simonov VM. Application of the *AlphaScreen* and *AlphaLisa* method in drug development and pharmacokinetic studies. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2022;(1):44–54. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2022-1-44-54>

Received: February 24, 2021. **Accepted:** March 02, 2022. **Published:** March 30, 2022

Список сокращений / List of abbreviations

AlphaLISA	Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay	Гомогенный иммунолюминесцентный анализ
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer	Биолюминесцентный резонансный перенос энергии
DELPHIA	Dissociation Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay	Иммуноанализ диссоциации с усиленной флуоресценцией лантаноидов
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	Иммуноферментный анализ
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer	Флуоресцентный резонансный перенос энергии
FLAG /HA/Myс/6xHis	Small tag	Низкомолекулярные метки
GCH	Glutation	Глутатион
GCP	Good clinical practice	Надлежащая клиническая практика
GLP	Good laboratory practice	Надлежащая лабораторная практика
GST	Glutathione-S-Transferase	Глутатион-трансфераза
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2	Рецептор эпидермального фактора роста 2
HTS	High throughput screening	Высокопроизводительный скрининг
IgG	Immunoglobulin G	Иммуноглобулин G
LOCI	Luminescent Oxygen Channeling Assay	Иммунолюминесцентный анализ, индуцируемый кислородом
MDM2/MDM4	Mouse double minute 2 homolog/mouse double minute 4 homolog	Двойной мышинный гомолог
Ni-NTA/poly-His	Nickel nitrilotriacetic acid/polyhistidine-tag	Полигистидиновые метки
PTMSELISA	ELISA sensitive to histone post-translational modifications	ИФА, специфичный к пост-трансляционным модификациям гистонов
RET	Resonance Energy Transfer	Резонансный перенос энергии
SCD	Sickle cell disease	Серповидно-клеточная анемия
TR-FRET	Time-resolved fluorescence energy transfer	Флуоресцентный резонансный перенос энергии с временным разрешением
TRF	Time – resolved fluorescence	Флуоресценция с временным разрешением
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Фактор роста (A) сосудов эндотелия

Введение / Introduction

Межмолекулярные взаимодействия биомолекул присущи каждому клеточному процессу. Любое перечисление основных тем исследований в биологии, например: репликация ДНК, транскрипция, трансляция, сплайсинг, секреция, контроль клеточного цикла, внутриклеточная передача сигнала (сигнальная трансдукция) и многое другое — также является перечислением процессов, в которых молекулярные комплексы вовлечены в качестве основных компонентов. Белки играют основную роль в таких взаимодействиях. Анализ взаимодействий белков в этих комплексах не является исключительной областью белковой биохимии. Другие области биологии, такие как генетика, клеточная биология, биология развития, и особенно молекулярная биология и биофизика практически полностью состоят из изучения и построения сетей взаимодействия биомолекул.

Разработка новых лекарственных препаратов не обходится без проведенных доклинических и клинических исследований, соответственно раздел фармакокинетики также не остаётся без внимания. Литературные данные о том, что метод AlphaLISA является методом чувствительным/прецизионным, дают нам право предположить о его уникальности и возможном его использовании в доклинических и клинических исследованиях при разработке новых лекарственных препаратов. Соответственно, целью данного обзора является изучение возможностей и недостатков методов Alpha, а также роль данного метода и фактическое применение в фармакокинетических исследованиях.

Определения различных методик межмолекулярных взаимодействий / Definitions of various methods of intermolecular interactions

Технология захвата — методика для измерения взаимодействий между биомолекулами, включая белок-белковые взаимодействия [1], белок-нуклеиновые взаимодействия [2], пост-трансляционные модификации (фосфорилирование белков) [3], белок-лигандные взаимодействия [4] и специфичные аналиты (цитокины, гормоны). Методом сближения в растворе изучаются биомолекулы, включая белки или нуклеиновые кислоты, а также и низкомолекулярные лиганды [5].

Для сближения донорных и акцепторных компонентов могут использоваться различные подходы. Наиболее яркими примерами являются биотин/стрептавидин, глутатион (GSH) / глутатион-С-трансфераза (GST), никель-NTA/полигистидин (Ni-NTA/polyHis), FLAG/anti-FLAG, HA/anti-HA, Мус/anti-Мус и антитела [6]. Многие из этих систем используют специфические последовательности — таги, которые могут быть генетически спроектированы в рекомбинантные белки (например, 6xHis, GST, FLAG, Мус), делая

пост-трансляционные химические модификации необязательными [7].

При зарождении биохимии и молекулярной биологии биологические взаимодействия изучали, используя гетерогенные подходы, когда молекулу, с которой изучается взаимодействие, можно закрепить на подложке либо специфически выделить из раствора. В таких методах происходит инкубация с раствором, где содержатся предполагаемые молекулы для связывания, и требуется отмывка от несвязавшихся молекул. К таким методам относятся иммунопреципитация, вестернблот, аффинная хроматография и пр. Такие классические подходы позволили выяснить и изучить многие фундаментальные взаимодействия, такие как строение молекулярных машин (например, рибосома или реплисома) или передачи внутри- и межклеточного сигнала в различных каскадах. Однако такие методы, где требуется изучить большое количество взаимодействий, малоприменимы. Другой подход состоит в том, чтобы изучать взаимодействия непосредственно в растворе без дополнительных манипуляций. Такие методы называют гомогенными, когда при взаимодействии между донором и акцептором возникает сигнал. Гомогенными методами сближения в растворе изучают биомолекулы, включая и макромолекулы, такие как белки или нуклеиновые кислоты, а также и низкомолекулярные лиганды [5].

Для детекции молекулярных взаимодействий в ряде систем в биологии и химии применяются техники на основе резонансного переноса энергии.

Резонансный перенос энергии (RET) — это безизлучательный перенос энергии от донора к акцептору, наблюдаемый только при их сближении на расстояние менее 10 нм. Для наблюдения *RET* также необходимо перекрытие спектра эмиссии донора со спектром поглощения акцептора, а также ориентация диполей донора и акцептора при этом не должна составлять угол 90°. На практике *RET* проявляется в изменении регистрируемого спектра испускания: уменьшении интенсивности испускания донора и появлении спектра испускания акцептора. В случае гибридизации молекулы донора с одним участником и молекулы акцептора с другим участником, появляется возможность изучения межмолекулярных, например, межбелковых взаимодействий в живых клетках. Также возможно изучение конформационных переходов в самой макромолекуле, если донор и акцептор локализованы на разных её концах, и расстояние между ними изменяется при конформационных перестройках. Соотношение интенсивности излучения акцептора к интенсивности излучения донора (*RET* сигнал) даёт возможность использования *RET* и для количественного анализа [8].

Общие типы гомогенных техник сближения с высокой пропускной способностью (HTS) включают: *FRET* (флуоресцентный резонансный перенос энергии), *BRET* (биолюминесцентный резонансный

перенос энергии), *TR-FRET* (разрешённый во времени флуоресцентный резонансный перенос энергии), Alpha (гомогенный иммунолюминесцентный анализ).

– Методика **FRET**

Методика *FRET* также известна как флуоресцентный резонансный перенос энергии. Это методика используется для изучения биомолекулярных конформаций и их динамики как в комплексе с другими молекулами [9], так и самостоятельно [10–13].

– Методика **BRET**

В работе *Vickers TA* [2] представлена разработка новой быстрой методики с высокой пропускной способностью. Методика основывается на биолюминесцентном резонансном переносе энергии, используя люциферазу *Nanoluc (Nluc)* [14, 15].

– Методика **TR-FRET**

Разрешённый во времени флуоресцентный резонансный перенос энергии — это техника на основе флуоресценции, которая блокирует анализ молекулярных взаимодействий в биохимических процессах. Принцип *TR-FRET* основывается на флуоресценции с временным разрешением (*TRF*) для измерения и флуоресценции резонансного переноса энергии между донорным и акцепторным частицами. Метод *TR-FRET* широко применяется для изучения киназной активности, белок-белковых взаимодействий, клеточных сигнализаций [16].

– Основы метода **Alpha** (*AlphaScreen*, *AlphaLISA*, *AlphaPLEX*)

В основе метода *Alpha* лежит хемилюминесценция, где синглетный кислород, генерируемый высокоэнергетическим облучением донорных частиц, диффундирует к акцепторным частицам. Синглетный кислород чрезвычайно нестабилен и может диффундировать на ограниченное расстояние около 200 нм. При сближении частиц синглетный кислород попадает в акцепторные частицы, что приводит к возбуждению каскадной серии химических реакций, в конечном счёте вызывая генерацию хемилюминесцентного сигнала. Молекулы, между которыми изучается взаимодействие, иммобилизуются на поверхности донорных и акцепторных частиц (рис. 1). Такой подход,

как технология на основе *FRET*, позволяет изучать взаимодействие молекул напрямую, без стадий отмывки, в отличие от многих других технологий (например, как ИФА). Благодаря этому технология *Alpha* использует протокол гомогенного состава, в котором время и количество операций при проведении анализа значительно уменьшаются.

Технология *Alpha* включает в себя методы *AlphaLISA*, *AlphaScreen* и *AlphaPlex*. Отличие между этими тремя технологиями состоит в различных наборах акцепторных частиц. К методу *AlphaScreen* относят акцепторные частицы, которые содержат красители — тиоксен, антрацен, рубрен. Рубрен излучает свет в диапазоне 520–620 нм. К методу *AlphaLISA* относят акцепторные частицы, содержащие хелатированный европий. Последний возбуждается светом с длиной волны 340 нм, возникающий в результате превращения тиоксена в производное diketона после его реакции с синглетным кислородом.

Возбуждённый хелат европия генерирует интенсивный свет, обнаруживаемый в гораздо более узком диапазоне длин волн с максимумом около 615 нм. Реагенты *AlphaPlex* позволяют регистрировать сигнал длиной 545 нм (частица–акцептор на основе тербия) или сигнал длиной 645 нм (частица–акцептор на основе самария). *AlphaPlex* позволяет детектировать несколько типов взаимодействий сразу.

История появления метода Alpha / The history of the Alpha method

Развитие технологии *Alpha* берёт начало от известного метода Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay (LOCI), или иммунолюминесцентный анализ, индуцируемый кислородом. В основе анализа лежит взаимодействие двух типов сферических микрочастиц (битсов). Один тип частиц (донор), при облучении светом, продуцирует синглетный кислород, который в свою очередь является хромогенным субстратом для хемилюминесценции в акцепторном типе частиц [17].

Данный метод впервые был описан Эдвином Ульманом и его коллегами в 1994 году. В дальнейшем метод был запатентован и получил развитие в компании Perkin Elmer как технология *Alpha*.

В 2001–2003 годах были опубликованы работы, где была описана технология *Alpha* (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay). В работах измеряли концентрацию cAMP [18], и фосфорилирование AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) [19].

В дальнейшем при развитии метода технологию *Alpha* применяли для изучения транскрипционных факторов, киназ, однонуклеотидного полиморфизма (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) и прочее.

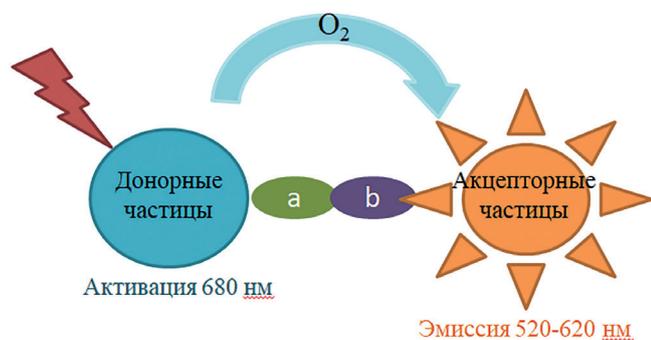


Рис. 1. Принцип работы метода Alpha
Fig. 1. The principle of operation of the Alpha method

Таблица 1

Сравнительная таблица (преимущества/недостатки методов)

Table 1

Comparative table (advantages/disadvantages of the methods)

Параметр /Метод	FP	Elisa/Delfia	FRET		AlphaScreen/AlphaLISA
Размер белка и/или комплекс	Меченый лиганд должен быть <1500 kDa и белок должен быть >10 000 Da	Без ограничений	Дистанция между донором и акцептором должна составлять не менее 9 нм		Дистанция между донором и акцептором должна составлять не менее 200 нм
Нижний предел чувствительности	nM; определяется с помощью Kd	До фемтограмм	Зависит от Kd, обычно 1–100 nM		До фемтограмм
Краситель	В основном органика флуоресцентные красители; предпочтительно красные (Alexa Fluor)	Лантаноиды (Delfia) или ферменты (пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза)	Донор: Al. Fluor 488 Al. Fluor 594 Европий Тербиум	Акцептор: Al. Fluor 555 Al. Fluor 647 XL665 Флюоресцеин	Донорные шарики производят синглетный кислород, который возбуждает акцепторные шарики с органическим или лантаноидным красителем
Дополнительные промывки	Нет	Да	Нет		Нет
Диапазон сигнала (высокий /низкий)	3–5 раз	4–5 порядков	<10 раз		2–3 порядка
Стоимость анализа	Низкая	Низкая	Средняя		Высокая
<p>Примечания: * – фемтограммы – единица измерения массы, доляная по отношению к единице системы СГС грамму и единице системы СИ килограмму. 1 фг = 10-15 г = 10-18 кг. Notes: * – femtograms – a unit of mass measurement, divided in relation to the unit of the СГС system gram and the unit of the СИ system kilogram. 1 фг = 10-15 г = 10-18 кг.</p>					
Arkin MR, 2012. Assay Guidance Manual					

Сравнение AlphaLISA с другими методиками / Comparison of AlphaLISA with other techniques

В исследованиях, проведенных учёным Prabhu L и его коллегами [20] было проведено сравнение методик AlphaLISA и TR-FRET, которое показало, что первая обладает большей чувствительностью, меньшей изменчивостью, а также способна автоматизироваться для крупномасштабного скрининга.

Для визуализации сравнительных характеристик методов ниже приведена табл. 1.

В последние годы технология Alpha стала довольно популярной в связи с универсальностью для многих методов. Она является очень чувствительной и эффективной на значительных расстояниях между донорными и акцепторными частицами (200 нм, по сравнению с TR-FRET 10–20 нм). После сравнения методов FRET, TR-FRET и AlphaScreen Glickman JF и соавт.[21] были сделаны выводы о том, что метод AlphaScreen обладает максимальной чувствительностью и динамическим диапазоном.

Этот анализ является простым, быстрым и более применимым к высокопроизводительным системам анализа, по сравнению с обычными методами для идентификации белок-белковых взаимодействий.

Применение Alpha метода при разработке лекарственных средств / Application of the Alpha method in the development of medicines

Метод Alpha используется в исследованиях таких молекулярных взаимодействий, как белок–белок, белок–лиганд, ДНК/РНК–белок. Он позволяет изучать передачу сигнала в клетках, изучать состав и работу молекулярных машин, искать перспективные лекарственные молекулы и многое другое. В таких исследованиях принципиальна высокая пропускная способность метода [22].

Высокопроизводительный скрининг (HTS) также необходим для эффективного отбора ингибиторов на основе малых молекул против специфичных мишеней. Ингибиторы, идентифицированные с помощью данной технологии, служат не только бесценным инструментом для изучения важных мишеней в канцерогенезе, но также обеспечивают перспективными кандидатами для терапии многих других болезней. Идеальный скрининг с высокой пропускной способностью должен быть легко воспроизводимым, чувствительным, масштабируемым, экономически незатратным и, самое важное, эффективным [23].

Одним из примеров подавления опухолей при раковых заболеваниях являются деубиквитиназы или ДУБы. Деубиквитиназы связаны со многими болезнями человека, включая неврологические расстройства, опухолевые заболевания и вирусные инфекции, что делает их превосходными кандидатами для фармакологического вмешательства. Многие ДУБы — это мультидоменные белки, которые очень трудно получить рекомбинантным путём в достаточных количествах. В этой связи необходим метод, исключающий необходимость получения рекомбинантного белка и подбор физиологически релевантной среды. Такой метод мог бы ускорить разработку терапевтически эффективных препаратов.

Применение *Alpha* технологии в сочетании с активной меткой гемагглютинаина (НА) деубиквитиназы обеспечивает хорошую платформу для поиска малых молекул деубиквитиназных ингибиторов в клеточном лизате. Деубиквитиназа (UCHL-1 убиквитин С-концевая гидролаза-1) содержит С-концевую человеческую метку гемагглютинаина (НА), которая позволяет ему связываться с акцепторными гранулами *AlphaLISA*, покрытые анти-НА антителами. В присутствии же цистеина и малых молекул в активном центре деубиквитиназы — переноса синглетного кислорода не происходит. Малые молекулы, способные ингибировать мечение деубиквитиназы — уменьшают альфа-сигнал, что подтверждает рабочую схему для разработки низкомолекулярных ингибиторов для терапевтического вмешательства [24].

Другой пример разработки новой иммунной технологии с высокопроизводительным скринингом на основе метода *AlphaLISA* описана в работе *Muneoka S* и соавт. [25]. Авторы данной работы задались целью установить платформу скрининга для выделения моноклональных антител, которые направлены напрямую против интактных мембранных белков, экспрессируемых на поверхности клеток. Была разработана клеточная система *AlphaLISA* для обнаружения взаимодействия между антеникотининовыми рецепторами ацетилхолина и никотиновыми рецепторами ацетилхолина, экспрессирующиеся на клетках. В принципе, разработанный формат анализа может быть дополнительно применён для оценки антител, нацеленных на любые виды интактных рецепторов клеточной поверхности, такие как GPCR и ионные каналы, любых видов с подходящей комбинацией гранул и лигандов.

Методы *AlphaScreen/AlphaPlex* используются в основном при поиске новых фармакологических препаратов или при изучении взаимодействий между биомолекулами. *AlphaLISA* использует хелат европия с гораздо более узким спектром эмиссии в 605–623 нм, что позволяет использовать метод в сложных матрицах (например сыворотка или плазма крови), где есть вещества со спектром поглощения для *AlphaScreen/AlphaPlex*. Таким образом, *AlphaLISA* больше используется как метод для определения концентраций раз-

ных веществ, в том числе терапевтически значимых метаболитов или белков, инфекционных агентов и пр., а также для изучения различных заболеваний и фармакокинетических исследований новых препаратов.

Применение метода AlphaLISA при изучении различных заболеваний / Application of the AlphaLISA method in the study of various diseases

На сегодняшний день метод *AlphaLISA* применяется при изучении заболеваний, включающих рак [26], атеросклероз [27], нейродегенеративное заболевание, характеризующееся нарушением двигательного контроля (болезнь Паркинсона) [28] и клеточную лейкемию (лимфома) [29].

Одним из направлений является изучение белков, выступающих в роли опухолевых супрессоров. Так, в статье *Xiong Y* [30], описан метод на основе *AlphaLISA* для поиска ингибиторов взаимодействий между белком p53 и его негативно регулируемыми лигандами, например, такими как MDM2 и MDM4. Белок p53, как хранитель генома, играет важную роль в регуляции клеточного цикла, апоптоза и репарации ДНК, защищая клетки от различных клеточных стрессов, таких как гипоксия и повреждение ДНК [31, 32]. Поэтому неудивительно, что белок p53 тесно связан с возникновением и ростом опухоли человека.

Целью работы *Nakahata S* и его коллег [29] было создание универсального анализа *AlphaLISA* для выявления взаимодействий между белком p53 и его негативно-регулируемыми лигандами. Донорные и акцепторные частицы соединяли между собой с помощью иммобилизованных антител против His-тага и антител анти-p53 к белку p53-His, соответственно, на донорных и акцепторных частицах. Эти антитела через молекулу p53 формируют мостик между донорными и акцепторными частицами. Однако, если в растворе присутствуют такие белки, как MDM2, конкурирующие с анти-p53-антителом за взаимодействие с TAD-доменом p53, связь между акцепторными и донорными частицами пропадает. В качестве модельной системы были выбраны белки MDM2 и MDM4, так как данные белки являются онкогенами, вследствие негативной регуляции активности p53. При связывании ингибитора (например, нитулина) с MDM2 или MDM4, данные белки не смогут продолжать связываться с белком p53, и флуоресцентный сигнал будет восстанавливаться. Таким образом, в данном методе можно находить ингибиторы взаимодействий между онкогенными белками MDM2 или MDM4 и белком p53.

Ишемическая болезнь сердца также является одной из основной причин смертности, первопричиной которой является атеросклероз. В статье *Yoshida Y* и его коллег [27] было проанализировано содержание антитела bRPA2, специфичного к белку RPA2-132, в сыворотке от пациентов с ишемической болезнью/сахарным диабетом и по сравнению с сывороткой

здоровых доноров. Метод *AlphaLISA* был использован в данной работе для оценки уровня антител в сыворотке и показал статистически значимый более высокий уровень. Для этого в анализе использовали акцепторные гранулы, конъюгированные с иммуноглобулинами (G) человека и донорные гранулы конъюгированные с глутатионом. В результате данного исследования методом *AlphaLISA* было выявлено статистически значимые более высокие уровни антител у пациентов с ишемической болезнью сердца/сахарным диабетом по сравнению со здоровыми донорами.

Возможности метода AlphaLISA / Features of the AlphaLISA method

С помощью метода *AlphaLISA* могут быть разработаны несколько видов анализов:

1. Детекция и количественная характеристика нескольких молекул в различных образцах (биомаркеры в сыворотке или плазме, фосфорилирование внутриклеточных белков в клеточных суспензиях и выделение белков из клеточного супернатанта).
2. Характеристика возможных белок-белковых взаимодействий, особенно в больших комплексах.
3. Измерения активности ферментов.
4. Детекция полноразмерных вирусов (прокариот/эукариот).
5. Промышленные процессы (скрининг примесных белков в производстве), для оценки чистоты биотерапевтических препаратов (белки клеток хозяина и остаточный белок-А).
6. Анализы иммунногенности [33].
7. Характеристика специфичности терапевтических ингибиторов.

Использование технологии AlphaLISA в фармакокинетических исследованиях / The use of AlphaLISA technology in pharmacokinetic research

Создание новых лекарственных препаратов предполагает обязательное проведение фармакокинетических исследований. В настоящее время в ряде медицинских центров созданы специальные подразделения для проведения фармакокинетических исследований с целью решения прикладных медицинских задач. Главной задачей фармакокинетики является проведение научно-обоснованной эффективной и безопасной фармакотерапии. Фармакологические исследования проводятся на различных этапах создания лекарственных средств (рис. 2): на стадии доклинического экспериментального изучения на животных, при ограниченных и расширенных клинических испытаниях, а также после внедрения лекарственного средства в медицинскую практику.

Большое внимание при исследовании фармакокинетики новых препаратов следует уделить разработке чувствительного и специфического метода определе-



Рис. 2. Схема разработки лекарственных препаратов
Fig. 2. Drug development scheme

Примечание: <https://www.nebiolab.com/drug-discovery-and-development-process/>

Note: <https://www.nebiolab.com/drug-discovery-and-development-process/>

ния концентрации препарата в биологических пробах. Чувствительность в идеале должна обеспечивать возможность устойчиво и достоверно определять концентрации, по крайней мере, в 20 раз меньше, чем средние максимальные уровни, наблюдаемые после приёма однократной дозы. Специфичность метода необходима для чёткого определения неизменённого препарата в присутствии его метаболитов и эндогенных соединений. Для отработки специфичности метода необходима его проверка в экспериментах на животных после установления структуры основных метаболитов, а также проверка воспроизводимости результатов анализа *in vitro*, когда к интактной сыворотке крови добавляют препарат в разных концентрациях [34].

Так как метод *AlphaLISA* зарекомендовал себя как чувствительный метод, то его использование было бы логичным в диагностике лекарственных препаратов при использовании малых доз. Однако анализ работ по фармакокинетике лекарственных препаратов (Pharmapendium, Pubmed), имеющих отношение к данному методу показал, что количество фармакокинетических исследований при клинических испытаниях не превышало 10. В табл. 2 приведены данные клинических испытаний на основе метода *AlphaLISA*.

В лаборатории авторов обзора были разработаны две методики на основе *AlphaLISA* для оценки концентрации двух разных терапевтических моноклональных антител в доклинических и клинических испытаниях. Исследователям удалось достигнуть валидированный нижний предел количественного определения (НПКО) в образцах сыворотки крови крыс, который составил 160 пг/мл, а в сыворотке крови человека – 62,5 пг/мл [неопубликованные данные].

Таблица 2

Фармакокинетические исследования с использованием метода *AlphaLISA*

Table 2

Pharmacokinetic studies using the *AlphaLISA* method

Наименование / год	Описание лекарства	Дозировка / Способ введения / Стадии исследований	Характеристики
Кризанлизумаб (Crizanlizumab) 2019 https://www.pharmapendium.com/browse/fda/Crizanlizumab/29903dd4d5e2fbd38ba4eaf1f8377408?query=alphalisa&includeSynonyms=true	Моноклональное антитело; предложено для лечения серповидно-клеточной анемии за счёт ингибирования опосредованных P-селектином клеточных адгезивных взаимодействий	100 мг/10 мл (10 мг/мл) Внутривенное введение Метод AlphaLISA был разработан для детекции анти-SeIG1 в сыворотке клинических исследований A2101(ФК, PD здоровые волонтеры) и A2201 (пациенты с SCD)	Метод AlphaLISA в данном исследовании не был валидирован
Тепротумумаб (Teprotumumab) 2020 https://www.pharmapendium.com/browse/fda/Teprotumumab/5b9480da06771e53cb29ff8704e6a74d?query=alphalisa&includeSynonyms=true Summary Review 761143/S-000 PDF 3791k	Моноклональное антитело; инсулин подобный фактор роста (IGF-1R) ингибирует развитие тиреоидной офтальмопатии	10 мг/кг начальная доза, в последующем 20 мг/кг каждые 3 недели. Рекомендуемый курс терапии 8 введений Внутривенное введение	Находится на стадии валидации
Бевацизумаб (Bevacizumab) (схож с продуктом Авастин) 2017 Chemistry Review 761028/S-000 Part 01 PDF 347k	Моноклональное антитело, присоединяется к изоформам VEGFA, которые были идентифицированы как регуляторы физиологической, патологической неоваскуляризации развития, поддерживающие рост опухоли и метастазирование	100 мг/4 мл и 400 мг/16 мл Внутривенное введение	Валидирован метод для определения бевацизумаба, не использующий клетки, такой как антипролиферационный метод. Это позволяет значительно ускорить анализ
Секукинумаб (Secukinumab) 2015 https://www.pharmapendium.com/browse/fda/Secukinumab/87ddf2615188f51b1f3a3d3eeb2e5c6f?query=alphalisa&includeSynonyms=true Approval Package 125504/S-001 Part 06 PDF 1650k https://www.pharmapendium.com/browse/fda/Secukinumab/2b5bc7274221783476b42d6a86d480f2?query=alphalisa&includeSynonyms=true	Человеческое моноклональное антитело взаимодействует с Интерлейкином 17A (IL-17A), ингибируя взаимодействия с рецепторами, в последующем с высвобождением противовоспалительных цитокинов, хемокинов и медиаторов повреждённых тканей	150 мг – доза Внутривенное введение 52 недели испытаний, из которых доступны 12 недель исследований Всего 2751 пациент получали Секукинумаб в течение, как минимум, 6 месяцев	Супернатанты культур (Человеческие фибробластоподобные синовиоциты), предварительно стимулированные TNF в комбинации с IL-17A, IL-17 A/F или IL-17 F секукинумабом, собирали после инкубации в ночь, и уровни MMP-3 определяли с помощью метода Alpha в анализе ELISA
Трастузумаб (Trastuzumab) 2019 https://www.pharmapendium.com/browse/fda/Trastuzumab/06fa09ff76ad05c720edd0137843224f?query=alphalisa&includeSynonyms=true	Рекомбинантное гуманизованное моноклональное антитело, производное ДНК, относится к IgG1, содержит рамочные регионы человека и комплементарно-определяющие регионы мышинных антител p185 HER2. Антитела селективно взаимодействуют с внеклеточным доменом белка-рецептора-2 к эпидермальному ростовому фактору человека (HER2) на поверхности злокачественных клеток и тормозят их пролиферацию	420 мг на флакон; Внутривенная инъекция Фаза I сравнительного фармакокинетического исследования (однократная доза в течение 8 недель); Фаза III сравнительная эффективность (54 недели активной терапии)	Валидирован метод для определения трастузумаба не использующий клетки, такой как антипролиферационный метод. Это позволяет значительно ускорить анализ [35]

Наименование / год	Описание лекарства	Дозировка / Способ введения / Стадии исследований	Характеристики
Инфликсимаб (Infliximab) 2015	Моноклональное антитело, состоящее из вариабельной (Fv) области высокоаффинных нейтрализующих мышинных моноклональных антител к фактору некроза опухоли-альфа и фрагмента молекулы IgG1 человека	100 мг лиофилизата инфликсимаба восстановленный в 15 мл флаконе для инъекций Внутривенная инъекция	TRPT-030698 квалификация TP-001698 FcGammaRIА присоединение с помощью метода AlphaLISA для ABP710 и инфликсимаба. Результаты подтверждают то, что метод AlphaLISA подходит для оценки диапазона привязывания (присоединения) [35]
Адалимумаб (Adalimumab) 2016	Рекомбинантное моноклональное антитело, пептидная последовательность которого идентична IgG1 человека. Препарат используется для лечения ревматоидного артрита, псориазического артрита, анкилозирующего спондилита, болезни Крона, язвенного колита, псориаза, гнойного аденита, увеита и ювенильного идиопатического артрита. Адлимумаб является селективным иммунодепрессантом	Фармакокинетическое сходство – однократная доза (40 мг) Идентификационный номер исследования-20120262	Сравнительные клинические исследования – III фаза – каждую неделю (40 мг) Продолжительность курса – 26 недель Идентификационный номер исследования-20120262 Сравнительные клинические исследования – III фаза – первый день первой недели – 80 мг, затем 40 мг со второй недели, каждую неделю Продолжительность курса – 52 недели Идентификационный номер исследования – 20120263

В ходе исследований при разработке метода были отмечены важные аспекты, которыми являются подбор условий сорбции частиц (антигенов, антител), выбор соотношения испытуемой матрицы (сыворотки, плазмы крови и пр.) к количеству реакционной смеси (суспензии частиц). Кроме того, проведённые эксперименты показали влияние состава буфера для разведения матрицы на неспецифическую агрегацию частиц. Немаловажным фактором для получения достоверного результата является и оптимизация температуры, времени инкубации на различных стадиях реакции и пробоподготовки.

В сравнении с другими высокочувствительными иммунологическими методами чувствительность *AlphaLISA* достигает фемтомолярных концентраций и сравнима с чувствительной ИФА (High Sensitivity

ELISA), при этом уступая методам на основе электрохемилюминисценции (ECL, V-plex™) или флуоресцентным методам на отдельных частицах на 1–2 порядка (Simoa, Erenna) [36].

Дискуссия / Discussion

Методы семейства *Alpha* – группа методов изучения межмолекулярных взаимодействий, успешно используемых в разных областях (изучение внутриклеточных взаимодействий, медицинская диагностика, эпидемиология, разработка лекарственных средств) как более быстрая и производительная, не требующая стадии отмывки альтернатива ИФА. Главным преимуществом *AlphaLISA* является возможность

автоматизации и миниатюризации метода за счёт небольшого числа стадий, возможности гомогенного протокола, небольшого объёма образца и широкого аналитического диапазона. Метод используется для создания быстрых скрининговых систем, в том числе полностью роботизированных. Ниже перечислены достоинства и недостатки методов *Alpha*.

Положительные качества метода AlphaLISA / Positive qualities of the AlphaLISA method:

1. Малое количество образца, необходимого для анализа;
2. Широкий диапазон измеряемых концентраций;
3. Сравнимая или более высокая чувствительность, до 10 раз выше по сравнению с аналогичным методом ИФА;
4. Отсутствие стадии отмывки от несвязавшихся компонентов исключает необходимость использования промывочных станций (вошеров) и, как следствие, хорошая масштабируемость для большого количества образцов при использовании роботизированных станций.

Недостатки AlphaLISA в диагностических исследованиях и фармакокинетике / Disadvantages of AlphaLISA in diagnostic studies and pharmacokinetics:

1. Специализированное, дорогостоящее оборудование (спектрофотометр с фильтрами определённой длины волны);
2. Стоимость и доступность реактивов;
3. Временные затраты для подбора условий и валидации метода;
4. Отсутствие стадии отмывки, с другой стороны, приводит к тому, что компоненты матрицы, тем не менее, могут отрицательно влиять на чувствительность метода, как в случае работы с сывороткой, что приводит к длительному подбору условий и концентраций компонентов для достижения хорошей чувствительности и воспроизводимости;
5. В фармакокинетических исследованиях клинических испытаний зачастую не приводятся характеристики использования данного метода, что указывает на существование проблем в воспроизведении данного метода;
6. Фоточувствительные компоненты.

Анализ по применению данного метода в клинических испытаниях показывает небольшое количество фармакокинетических исследований терапевтических биопрепаратов. Учитывая тот факт, что с каждым годом требования, установленные GLP / GCLP и GCP, к биоаналитическим методам становятся все строже, далеко не каждый метод, использующийся в научных исследованиях, может быть применим и валидирован в клинических исследованиях.

ИФА как классический метод используется более 40 лет в фармакокинетических исследованиях. Однако

ИФА часто требует большого количества образца, плохо масштабируем и более продолжителен по времени проведения анализа вследствие гетерогенного подхода. Несомненно, классические методы, такие как ИФА, для исследования фармакокинетики имеют преимущество т. к. метод хорошо изучен, есть инструментальная база для работы с ИФА в большом количестве лабораторий. Однако там, где существуют ограничения ИФА, следует применять более чувствительные, производительные методы или основанные на других физико-химических подходах.

Валидированные методы *AlphaLISA* применяются в анализе фармакодинамики различных биологических маркеров в доклинических и клинических исследованиях [37]. Для *AlphaLISA* разработаны методы для определения TNF α [38], CD80 [39], цитокинов (IL2, IL6, IL17) [36, 37], иммуноглобулинов G1 и G4 классов [40–42], интерферон гамма [43] и много другое. Это свидетельствует о том, что для известных аналитов метод AlphaLISA хорошо валидируется и разработанные наборы пользуются популярностью.

Заключение / Conclusion

Как и в любой технологии, в методе *Alpha* существуют свои преимущества и ограничения. Основными недостатками данной технологии является фоточувствительность, влияние компонентов матрицы (например, поглощение синглетного кислорода), трудности с разработкой и валидацией метода. Основные преимущества этой технологии заключаются в том, что она применима к очень широкому спектру анализируемых веществ. Методика имеет возможность использовать маленькие количества образца и применять гомогенные, быстрые и чувствительные протоколы, в отличие от классических методов иммуноанализа. Кроме того, *Alpha* технологии не требуют введения больших флуоресцентных меток, которые могут стерически препятствовать биомолекулярным взаимодействиям.

Методы *Alpha* широко используются для обнаружения новых кандидатов для терапевтических препаратов, изучения межбелковых взаимодействий и многое другое, где требуется скринировать большое количество молекул на взаимодействие.

Несмотря на некоторые недостатки, *AlphaLISA* ограниченно используется в фармакокинетических исследованиях. *AlphaLISA* применяют для рутинных анализов в фармакодинамических исследованиях биологических и терапевтических маркеров, где разработанная методика может быть валидирована согласно требованиям регуляторов, и при наличии приборной базы стоимость одного анализа становится конкурентоспособной при сохранении высокой чувствительности количественных методов.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ
ADDITIONAL INFORMATION**

Участие авторов. Мухаметшина Р.Т. — написание основного текста, редактирование; Копеин Д.С. — написание части текста, редактирование; Симонов В.М. — редактирование.

Participation of authors. Mukhametshina RT — writing the main text, editing; Kopein DS — writing part of the text, editing; Simonov VM — editing.

Благодарности. Выражаем благодарность за помощь в техническом редактировании обзора — Лягоскину И.В., Пантюшенко М.С., Лисицыной О.М., Аббасовой С.Г.

Acknowledgements. We express our gratitude for the help in the technical editing of the review — Lyagoskin IV, Pantyushenko MS, Lisitsyna OM, Abbasova SG.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Мухаметшина Регина Талгатовна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: rtmukhametshina@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6170-5221>

к. б. н., м. н. с. АО «ГЕНЕРИУМ»,
Владимирская область, Россия

Mukhametshina Regina T.

Corresponding author

e-mail: rtmukhametshina@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6170-5221>

PhD Biological Sci., junior researcher,
JSC «GENERIUM», Vladimir region, Russia

Копеин Дамир Сергеевич

e-mail: kopein@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1176-5829>

к. б. н., н. с. АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская
область, Россия

Kopein Damir S.

e-mail: kopein@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1176-5829>

PhD Biological Sci., research scientist,
JSC «GENERIUM», Vladimir region, Russia

Симонов Владимир Михайлович

e-mail: simonov@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0879-5595>

с. н. с. АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская
область, Россия

Simonov Vladimir M.

e-mail: simonov@ibcgenerium.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0879-5595>

senior researcher JSC «GENERIUM», Vladimir
region, Russia

Список литературы / References

1. Waller H, Chatterji U, Gallay P et al. The use of AlphaLISA technology to detect interaction between hepatitis C virus encoded NS5A and cyclophilin A. *J Virol Methods*. 2010;165(2):202–210. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.01.020.

2. Vickers TA, Crooke ST. Development of a Quantitative BRET affinity assay for nucleic acid-protein interactions. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161930. DOI: 10.1371/journal.pone.0161930.

3. Guenat S, Rouleau N, Biemann C et al. Homogeneous and nonradioactive high-throughput screening platform for the characterization of kinase inhibitors in cell lysates. *J Biomol Screen*. 2006;11(8):1015–1026. DOI: 10.1177/1087057106294697.

4. Гильмиярова Ф.Н., Рыскина Е.А., Колотьева Н.А., Потехина В.И., Горбачева И.В. Белок-лигандные взаимодействия: влияние минорных компонентов метаболизма. *Siberian Medici Review*. 2017;(6):12–21. [Gylmiyarova FN, Ryskina EA, Kolotieva NA, Potekhina VI, Gorbacheva IV. Protein-ligand interactions: the influence of minor components of metabolism. *Siberian Medici Review*. 2017;(6):12–21. (In Russ).] DOI: 10.20333/2500136-2017-6-12-21.

5. Coussens NP, Auld D, Roby P et al. Compound-mediated assay interferences in homogenous proximity assays. *Assay Guidance Manual*. Review. 2020; NBK553584.

6. Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr Protoc Protein Sci*. 2013;73:9.9.1-9.9.23. DOI: 10.1002/0471140864.ps.0909s73.

7. Fairhead M, Howarth M. Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. *Methods Mols Biol*. 2015;1266:171–184. DOI: 10.1007/978-1-4939-2272-7_12.

8. Смирнова Д.В. Гибридные белки и конъюгаты на основе люциферазы светлячков *Luciola Mingrelica* и их биоаналитическое применение. Диссертация на соискание ученой степени. Хим. факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова. — Москва; 2015. [Smirnova DV. Gibridnye belki i kon'yugaty na osnove lyutsiferazy svetlyakov *Luciola Mingrelica* i ikh bioanaliticheskoe primeneniye. Dissertatsiya na soiskanie uchenoi stepeni. Khim. fakul'tet, MGU im. M.V. Lomonosova. Moscow; 2015. (In Russ).]

9. Mekler V, Kortkhonja E, Mukhopadhyay J et al. Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell*. 2002;108(5):599–614. DOI: 10.1016/s0092-9674(02)00667-0.

10. Ha T, Enderle T, Ogletree DF et al. Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(13):6264–6268. DOI: 10.1073/pnas.93.13.6264.

11. Kalinin S, Peulen T, Sindbert S et al. A toolkit and benchmark study for FRET-restrained high-precision structural modeling. *Nat Methods*. 2012;9(12):1218–1225. DOI: 10.1038/nmeth.2222.

12. Hellenkamp B, Wortmann P, Kandzia F et al. Multidomain structure and correlated dynamics determined by self-consistent FRET Networks. *Nat Methods*. 2017;14(2):174–180. DOI: 10.1038/nmeth.4081.

13. Hellenkamp B, Schmid S, Doroshenko O et al. Precision and accuracy of single-molecule FRET measurements—a multi-laboratory benchmark study. *Nat Methods*. 2018;15(9):669–676. DOI: 10.1038/s41592-018-0085-0.

14. Machleidt T, Woodrooffe CC, Schwinn MK et al. NanoBRET—a novel BRET platform for the analysis of protein-protein interactions. *ACS Chem Biol*. 2015;10(8):1797–1804. DOI: 10.1021/acscchembio.5b00143.

15. Wang J, Ren J, Wu B et al. Activation of Rab8 guanine nucleotide exchange factor Rabin8 by ERK1/2 in response to EGF signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(1):148–153. DOI: 10.1073/pnas.1412089112.
16. Ergin E, Dogan A, Parmaksiz M et al. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) assays for biochemical processes. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(14):1222–1230. DOI: 10.2174/1389201017666160809164527.
17. Ullman EF, Kirakossian H, Singh S et al. Luminescent oxygen channeling immunoassay: Measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(12):5426–5430. DOI: 10.1073/pnas.91.12.5426.
18. Gabriel D, Vernier M, Pfeifer MJ et al. High throughput screening technologies for direct cyclic AMP measurement. *Assay Drug Dev Technol*. 2003;1(2):291–303. DOI: 10.1089/15406580360545107.
19. Li Y, Cummings RT, Cunningham BR. Homogeneous assays for adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase. *Anal Biochem*. 2003;321(2):151–156. DOI: 10.1016/s0003-2697(03)00397-x.
20. Prabhu L, Chen L, Wie H et al. Development of AlphaLISA high throughput technique to screen for small molecule inhibitors targeting protein arginine methyltransferases. *Mol Biosyst*. 2017;13(12):2509–2520. DOI: 10.1039/c7mb00391a.
21. Glickman JF, Wu X, Mercuri R et al. A comparison of ALPHAScreen, TR-FRET and TRF as assay methods for FXR nuclear receptors. *J Biomol Screen*. 2002;7(1):3–10. DOI: 10.1177/108705710200700102.
22. Eglén RM, Reisine T, Roby P et al. The use of AlphaScreen technology in HTS: current status. *Curr Chem Genomics*. 2008;1:2–10. DOI: 10.2174/1875397300801010002.
23. Prabhu L, Wei H, Chen L et al. Adapting AlphaLISA high throughput screen to discover a novel small molecule inhibitor targeting protein arginine methyltransferase 5 in pancreatic and colorectal cancers. *Oncotarget*. 2017;8(25):39963–39977. DOI:10.18632/oncotarget.18102.
24. Ott CA, Baljinnayam B, Zakharov AV et al. Cell lysate based AlphaLISA deubiquitinase assay platform for identification of small molecule inhibitors. *ACS Chem Biol*. 2017;12(9):2399–2407. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00543.
25. Muneoka S, Nakamura R, Hoshino M et al. Development of a novel immunoassay to select antibodies against intact membrane antigens by using the homogeneous AlphaLISA system. *J Biosci Bioeng*. 2018;126(4):522–526. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.04.018.
26. Yin H, Wang L, Liu HL. ENO1 Overexpression in Pancreatic Cancer Patients and Its Clinical and Diagnostic Significance. *Gastroenterol Res Pract*. 2018;2018:3842198. DOI: 10.1155/2018/3842198.
27. Yoshida Y, Hiwasa T, Machida T et al. Elevation of autoantibody in patients with ischemic stroke. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2018;58(7):303–310. DOI: 10.2176/nmc.ra.2018-0022.
28. Crans AJR, Wouters E, Valle-Leon M et al. Striatal Dopamine D2-muscarinic acetylcholine M1 receptor-receptor interaction in a model of movement disorders. *Front Pharmacol*. 2020;11:194. DOI: 10.3389/fphar.2020.00194.
29. Nakahata S, Syahrul C, Nakatake A. Clinical significance of soluble CADH1 as a novel marker for adult T-cell leukemia/Lymphoma. *Haematologica*. 2021;106(2):532–542. DOI: 10.3324/haematol.2019.234096.
30. Xiong Y, Wu Y, Luo S et al. Development of a novel immunoassay to detect interactions with the transactivation domain of p53: application to screening of new drugs. *Sci Rep*. 2017;7(1):9185. DOI: 10.1038/s41598-017-09574-7.
31. Hainaut P, Hollstein M. P53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*. 2000;77:81–137. DOI: 10.1016/s0065-230x(08)60785-x.
32. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*. 2009;137(3):413–431. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.037.
33. Bielefeld –Sevigny M. AlphaLISA immunoassay platform – the “no wash” high-throughput alternative to Elisa. *Assay Drug Dev Technol*. 2009;7(1):90–92. DOI: 10.1089/adt.2009.9996.
34. Беленичев ИФ. Фармакокинетический мониторинг лекарственных средств. Учебное пособие для магистров специальности: 224. Технологии медицинской диагностики и лечения и для студентов специальности 7.12020101 Фармация. Бухтиярова НВ, Павлов СВ, Рыжов АА, Рыженко ВП. Запорожье. 2018; 94 с. [Belenichev IF. Farmakokineticheski monitoring lekarstvennykh sredstv. Uchebnoe posobie dlya magistrów spetsial'nosti: 224. Tekhnologii meditsinskoi diagnostiki i lecheniya i dlya studentov spetsial'nosti 7.12020101 Farmatsiya. Bukhtiyarova NV, Pavlov SV, Ryzhov AA, Ryzhenko VP Zaporozh'e; 2018. (In Russ).].
35. Morra L, Moser R. Alpha technology: a fast and sensitive orthogonal approach to cell-based potency assays. Perkin Elmer. Доступно по: https://www.ibr-inc.com/fileadmin/Downloads/REAGENTS_AlphaLISA_Bevacizumab_AppNote.pdf. Ссылка активна на 17.02.2021.
36. Yeung D, Ciotti S, Purushothama S et al. Evaluation of highly sensitive immunoassay technologies for quantitative measurements of sub pg/mL levels of cytokines in human serum. *J Immunol Methods*. 2016;437:53–63.
37. Modi KN, Parikh PK, Sen DJ. AlphaLISA biomarker as a tool of drug discovery and development. *Drug Dev & Res*. 2011;3(2):64–74. Доступно по: <https://www.ijddr.in/drug-development/alphalisa-biomarker-as-a-tool-of-drug-discovery-anddevelopment.pdf>. Ссылка активна на 17.02.2021.
38. Carlstrom J, Wilchek T, Kwei A. Development of pharmacokinetic (PK) assays for detecting biosimilars targeting TNF α using AlphaLISA. PerkinElmer. Доступно по: [https://www.perkinelmer.com/labsolutions/resources/docs/APP_AlphaLISA_Pharmacokinetic_TNF \$\alpha\$.pdf](https://www.perkinelmer.com/labsolutions/resources/docs/APP_AlphaLISA_Pharmacokinetic_TNFalpha.pdf). Ссылка активна на 17.02.2021.
39. Human CD80 AlphaLISA detection kit. Perkin Elmer, product №AL3055C/F. Доступно по: <https://www.perkinelmer.com/product/alphalisa-cd80-human-kit-100pts-al3055hv>. Ссылка активна на 17.02.2021.
40. Wu Q, Lee HY, Wong PY et al. Development and applications of AlphaScreen – based FcRn binding assay to characterize monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 2015;420:31–37. DOI: 10.1016/j.jim.2015.03.012.
41. Leary BA, Lawrence-Henderson R, Mallozzi C et al. Bioanalytical platform comparison using a generic human IgG PK assay format. *J Immunol Methods*. 2013;397(1-2):28–36. DOI: 10.1016/j.jim.2013.08.009.
42. Human immunoglobulin G subclass 1(IgG1) (pharmacokinetic) kit, Perkin Elmer, product № AL303 C/F. Доступно по: https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/TDS_AlphaLISA_AL303.pdf. Ссылка активна на 17.02.2021.
43. IFN- γ (human) AlphaLISA Detection kit. Доступно по: <https://www.perkinelmer.com/product/alphalisa-ifn-gamma-kit-500-assay-pts-al217c>. Ссылка активна на 17.02.2021.