

泰它西普免疫原性分析方法建立及验证

吴白杨¹, 刘志浩², 刘美玲², 王凌², 姜静^{1*}

(1. 滨州医学院, 烟台 264003; 2. 荣昌生物制药(烟台)股份有限公司, 烟台 264006)

摘要 **目的:**建立桥式酶联免疫吸附法测定食蟹猴血清中抗药抗体(anti-drug antibody, ADA)和竞争酶联免疫吸附法测定中和抗体(neutralizing antibody, NAb),并进行方法学验证。**方法:**桥式酶联免疫吸附法在96孔板预包被泰它西普(代号:RC18),与待测样品中的抗RC18抗体结合形成复合物,依次加入生物素化的RC18(Biotin-RC18)、辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(SA-HRP)和四甲基联苯胺底物(TMB)显色,终止反应后在酶标仪450 nm/630 nm波长处读取吸光度。竞争酶联免疫吸附法在96孔板预包被B细胞激活因子或增殖诱导配体蛋白,加入与Biotin-RC18预混合的样品,形成B细胞激活因子或增殖诱导配体-抗RC18抗体-Biotin-RC18三者的复合物,依次加入SA-HRP和TMB显色,终止反应后在酶标仪上读取吸光度。**结果:**桥式酶联免疫吸附法线性范围的精密度 $\leq 12.32\%$,灵敏度为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,筛选临界阈值为0.937,确证临界阈值为23.62%。竞争酶联免疫吸附法方法线性范围的精密度 $\leq 20\%$,灵敏度为 $312.50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,针对靶标B细胞激活因子和增殖诱导配体的NAb活性,判断阈值分别为0.79和0.69,可耐受血清中RC18的药物浓度分别为2.5和 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。**结论:**方法学验证结果表明,桥式酶联免疫吸附法及竞争酶联免疫吸附法均符合临床前生物制品免疫原性研究的要求,可用于食蟹猴血清中ADA及ADA阳性样本NAb的检测。

关键词:泰它西普;免疫原性;抗药抗体;中和抗体;桥式酶联免疫吸附法;竞争酶联免疫吸附法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)02-0264-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.02.09

Development and validation of immunogenicity methods for detecting telitacept

WU Bai-yang¹, LIU Zhi-hao², LIU Mei-ling², WANG Ling², JIANG Jing^{1*}

(1. Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; 2. RemeGen, Co., Ltd., Yantai 264006, China)

Abstract Objective: To establish a bridging enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for the determination of anti-drug antibody (ADA) and a competitive ELISA method for the determination of neutralizing antibody (NAb) in cynomolgus monkey serum, and to conduct methodological validation. **Methods:** The steps of bridging ELISA method were as follows: the 96-well plates were precoated with telitacept (RC18) which could combine with anti-RC18 antibody in the samples to form a complex, then were sequentially added biotinylated RC18 (Biotin-RC18), horseradish peroxidase conjugated streptavidin (SA-HRP), and tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution for color development. After terminating the reaction, the absorbance was read at a

* 通信作者 Tel: (0535)6913525; E-mail: jing_jiang1974@sina.com

第一作者 Tel: 15767143698; E-mail: wwubaiyang@163.com

wavelength of 450 nm/630 nm on an ELISA reader. The procedures of competitive ELISA method were as follows: the 96 - well plates were precoated with B - cell activation factor of the TNF family (BAFF) or a proliferation inducing ligand (APRIL) protein and then were added the samples which was pre - mixed with Biotin - RC18 to form BAFF or APRIL anti - RC18 - antibody and Biotin - RC18 complex. SA - HRP and TMB substrate solution for color development were added sequentially. After terminating the reaction, the absorbance was read at an ELISA reader with dual wave length. **Results:** The precision of linear range of bridging ELISA method was less than 12.32%, the sensitivity was $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, the critical threshold of screening was 0.937, and the critical threshold of confirmation was 23.62%. The precision of the linear range of competitive ELISA method was less than 20%, the sensitivity was $312.50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the threshold for determining the activity of NAb against the target BAFF and APRIL was 0.79 and 0.69, respectively. On BAFF and the method of research targets respectively can tolerate $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RC18 in serum. **Conclusion:** The results of method validation indicate that both bridging ELISA and competitive ELISA meet the requirements of preclinical immunogenicity studies of biological products, and can be used for analysis of the concentrations of ADA and NAb in cynomolgus monkey serum.

Keywords: telitacicept; immunogenicity; anti - drug antibody (ADA); neutralizing antibody (NAb); bridging ELISA; competitive ELISA

B 淋巴细胞刺激物 (B lymphocytes stimulator, BLyS) 又称 B 细胞激活因子 (B - cell activation factor to the TNF family, BAFF), 与增殖诱导配体 (A proliferation inducing ligand, APRIL) 同属肿瘤坏死因子配体家族。研究表明, 系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 患者的 BAFF 与 APRIL 水平升高, 且高水平的 BAFF 及 APRIL 与 SLE 患者的高疾病活动度和高复发率密切相关, 原因可能是 BAFF 与 APRIL 共同调控 B 淋巴细胞存活、增殖、分化及抗体分泌, 具体作用机制主要与 BAFF 和 APRIL 的下游调控靶点有关, BAFF 与 APRIL 在 SLE 发病机制中起着重要作用^[1]。

泰它西普 (代号: RC18) 是荣昌生物制药 (烟台) 股份有限公司自主研发的治疗 SLE 的“双靶点” (BAFF 和 APRIL) I 类新型生物技术药物, 由 BAFF 及 APRIL 的共同配体穿膜蛋白活化物片段与人体 IgG 蛋白 Fc 片段融合构成, 通过抑制 BAFF 和 APRIL 2 个细胞因子的过度表达, 进一步抑制异常 B 细胞的成熟和分化, 从而实现“双管齐下”降低机体自身免疫反应的作用。

治疗性蛋白类药物与小分子化合物不同, 具有较强的免疫原性, 进入机体后可能因较强的刺激使机体产生特异抗体, 因此, 免疫原性分析是生物技术药物临床前和临床研究的重要内容之一。

抗药抗体 (anti - drug antibody, ADA) 是定义该类药物免疫原性的主要指标, ADA 产生会对药物暴露、药物代谢动力学特征等造成影响; 中和抗体 (neutralizing antibody, NAb) 作为 ADA 的一个子集, 构成免疫原性研究和评价的重要部分, 具有抑制药物生物学活性的能力, 可通过阻断产品到达其靶标或干扰受体/配体结合, 从而干扰药物的体内活性, 造成对药效的影响或机体的过敏反应、免疫抑制、自身免疫反应等从轻微到危及生命的不良反应^[2-3]。

本研究建立桥式酶联免疫吸附法检测食蟹猴中的 ADA 和竞争酶联免疫吸附法检测食蟹猴中的 NAb, 并进行系统方法学评估, 为测定食蟹猴体内的 ADA 及 NAb 提供科学有效的方法^[4-7]。

1 试药与仪器

1.1 试药

注射用 RC18 (批号 2017002, $80 \text{ mg} \cdot \text{支}^{-1}$)、小鼠抗 RC18 抗体 (阳性对照抗体, 批号 M20170426), 荣昌生物制药 (烟台) 股份有限公司; Biotin - RC18 (批号 20180328), 荣昌生物制药 (烟台) 股份有限公司提供 RC18, 湖州嘉暄生物科技有限公司标记; BAFF 蛋白 (批号 2149 - BF/CF/ EFV4017091)、APRIL 蛋白 (批号 5860 - AP/ TCF0917012), R&D Systems 公司; 碳酸盐缓冲溶液 (批号 SLBT1007)、辣根

过氧化物酶标记链霉亲和素 (SA - HRP, 批号 SLBR5305V)、吐温 - 20 (批号 SZBE2460V), Sigma 公司; 杜氏磷酸盐缓冲液 (DPBS, 批号 180718), Biotopped 公司; Super block (批号 TD263426), Thermo Scientific 公司; 牛血清白蛋白 (BSA, 批号 20180124), 国药集团化学试剂有限公司; 显色液: 四甲基联苯胺底物 (TMB, 批号 180416), Neogen Corporation 公司; 浓硫酸 (批号 20180716), 购自北京化工厂; 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris - HCl, 货号 YUKSX), 山东思科捷生物技术有限公司; 空白食蟹猴血清, 广东蓝岛生物技术有限公司。

1.2 仪器

SpectraMax M5 型酶标仪, Molecular Device 公司; LRH - 150F 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; MB100 - 4A 型微孔板恒温震荡器, 杭州奥盛仪器有限公司; XS205DU 十万分之一型电子天平, Mettler Toledo 公司; 405LS 型洗板机, BioTek 公司; 3599 型 96 孔高吸附酶标板, Corning 公司。

2 方法学验证与结果分析

2.1 方法建立

2.1.1 桥式酶联免疫吸附法检测 ADA 浓度

用碳酸盐缓冲溶液将 RC18 稀释至 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以每孔 $100 \mu\text{L}$ 加入 96 孔酶标板中, 于 $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜; 弃掉孔内液体; 每孔加入含 0.2% 吐温 - 20 的 DPBS (DPBST) $300 \mu\text{L}$ 进行洗板 3 次, 拍干, 加入 Super block $250 \mu\text{L}$ 室温封闭 2 h。另外取检测样品 $30 \mu\text{L}$, 加入 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 醋酸溶液 $180 \mu\text{L}$ 于 1.5 mL EP 管中进行酸化处理, 室温孵育 1 h。弃掉孔内封闭液, 每孔加入 DPBST $300 \mu\text{L}$ 洗板 3 次, 拍干; 预先加入中和液 ($1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ Tris - HCl) $30 \mu\text{L}$, 再每孔加入酸化处理后的样品 $70 \mu\text{L}$, 于室温震荡孵育 1 h; 洗板 6 次, 每孔加入 $1.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Biotin - RC18 溶液 $100 \mu\text{L}$, 室温震荡孵育 1 h; 洗板 6 次, 每孔加入 SA - HRP $100 \mu\text{L}$, 其中 SA - HRP 用含 3% BSA 的 DPBST 进行 1:50 000 稀释, 室温孵育 1 h; 洗板 6 次, 每孔加入 TMB 显色液 $100 \mu\text{L}$, 避光显色 $15 \sim 20 \text{ min}$; 每孔加入硫酸溶液 ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $50 \mu\text{L}$ 进行终止。用酶标仪读取 $450 \text{ nm} / 630 \text{ nm}$ 波长处的吸收度, 并保存数据。

2.1.2 竞争酶联免疫吸附法检测 NAb 浓度

将靶标蛋白 BAFF 或 APRIL 用碳酸盐缓冲溶

液稀释至 $400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按每孔 $100 \mu\text{L}$ 加入 96 孔酶标板中, $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜; 洗板与封闭步骤要求与“2.1.1”方法相同; 待测样品与 Biotin - RC18 以 1:1 体积混合 (Biotin - RC18 用空白食蟹猴血清分别配制为 $1 000$ 和 $2 000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别用于 BAFF 和 APRIL 靶标的中和活性检测), 每孔 $100 \mu\text{L}$, 洗板 6 次, 每孔加入 SA - HRP $100 \mu\text{L}$, 其中 SA - HRP 用 3% BSA 的 DPBST 进行 1:50 000 稀释, 室温孵育 1 h; 显色与终止步骤与“2.1.1”方法相同。用酶标仪 $450 \text{ nm} / 630 \text{ nm}$ 波长处读取吸收度, 并保存数据, 若存在中和活性抗体, 则仪器响应值降低。

2.1.3 数据采集及统计分析

使用 Softmax Pro software (version 5.4) 按照四参数进行拟合处理, 其权重系数 = $1 / Y^2$; 用 Microsoft Office Excel (2007) 进行各验证样本数据统计分析, 包括均值、标准差 (SD)、RSD 等。

2.2 方法验证与结果分析

2.2.1 桥式酶联免疫吸附法

2.2.1.1 筛选实验阈值 选取 26 个空白食蟹猴血清作为筛选实验阈值 (screening cut point, SCP) 验证样品, 由 2 名分析员分别在 3 d 内运行 26 个 SCP 样品。为避免外界环境因素对分析批测定值的影响, 方法的 SCP 采用信噪比 (S/N) 替代仪器响应值的计算方式 ($S/N = \text{样品复孔的吸收度均值} / \text{阴性空白对样品复孔吸收度均值}$)。结果见表 1, 剔除超限值后, 抗 RC18 抗体检测的 SCP 为 0.937, 数据基本符合正态分布, 可以采用均值的 95% 置信区间设定固定阈值。分析批 SCP 的对数值 = 空白个体血清的 S/N 对数值均值 + $1.645 \times \text{SD}$, 1.645 为 95% 的正态分布临界值。

2.2.1.2 确证实验阈值 将至少来源于 6 只空白食蟹猴的混合空白血清作为阴性对照样品。用阴性对照样本将 RC18 稀释至 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为原液 A, 用“2.2.1.1”中的 26 个 SCP 验证样本将原液 A 稀释至 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为确证实验阈值 (confirmatory cut point, CCP) 样本。由 2 名分析员分别在 3 d 内运行 26 个 CCP 样本。

结果见表 2, 抗 RC18 抗体检测的 CCP 为 23.62%, 抑制率 = $(1 - \text{加药后样本的 } S/N \text{ 值} / \text{未加药样品的 } S/N \text{ 值}) \times 100\%$; CCP = 抑制率均值 + $2.33 \times \text{SD}$, 2.33 为 99.9% 的正态分布临界值。

表 1 SCP 验证结果
Tab. 1 Validation results of SCP

个体号 (individual)	lg(S/N)					
	分析员 1 (analyst 1)			分析员 2 (analyst 2)		
	分析批 1 (batch 1)	分析批 2 (batch 2)	分析批 3 (batch 3)	分析批 1 (batch 1)	分析批 2 (batch 2)	分析批 3 (batch 3)
1	-0.10	-0.09	-0.10	-0.10	-0.09	-0.13
2	-0.09	-0.11	-0.11	-0.11	-0.09	-0.12
3	-0.08	-0.12	-0.20	-0.10	-0.20	-0.14
4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	-0.05	-0.07	-0.13	-0.07	-0.08	-0.06
6	-0.05	-0.06	-0.13	-0.06	-0.11	-0.03
7	-0.09	-0.09	-0.18	-0.12	-0.13	-0.10
8	-0.02	0.03	-0.06	-0.02	0.03	0.01
9	-0.06	-0.04	-0.15	-0.10	0.05	-0.09
10	-0.12	-0.13	-0.20	-0.14	-0.14	-0.13
11	-0.07	-0.11	-0.24	-0.11	-0.18	-0.08
12	-0.10	-0.11	-0.21	-0.14	-0.15	-0.11
13	-0.04	-0.11	-0.18	-0.12	-0.15	-0.11
14	-0.05	-0.06	-0.15	-0.07	-0.06	-0.05
15	-0.02	-0.03	-0.17	-0.03	-0.03	-0.05
16	-0.02	-0.02	-0.09	-0.05	-0.07	-0.06
17	-0.07	-0.08	-0.15	-0.10	-0.14	-0.10
18	-0.04	-0.06	-0.20	-0.12	-0.14	-0.09
19	-0.04	-0.06	-0.18	-0.09	-0.12	-0.05
20	-0.09	-0.13	-0.24	-0.13	-0.16	-0.10
21	-0.03	-0.07	-0.21	-0.09	-0.09	-0.07
22	-0.07	-0.13	-0.24	-0.06	-0.13	-0.14
23	NA	NA	NA	NA	NA	NA
24	-0.08	-0.04	-0.21	-0.10	-0.16	-0.10
25	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26	-0.06	-0.02	-0.15	-0.09	-0.02	NA
均值(mean)	-0.06	-0.07	-0.17	0.03	-0.10	-0.09
SD	0.03	0.04	0.05	-0.03	0.06	0.04
lg(SCP)	-0.02	-0.01	-0.09	-0.09	0.00	-0.03
lg(SCP)均值(mean)			-0.03			
SCP			0.937			

注 (note): NA 为超限值不再进行计算 (NA was not involved in the inhibition rate calculation)

2.2.1.3 系统适用性及精密度 系统适用性验证考察了不同分析员、仪器和实验日期对阴性对照、低浓度、高浓度和确证质控 4 种样品的影响。结果显示,4 种样品批内精密度 RSD 范围为 1.2%~8.1%;批间精密度 RSD 范围分别为 8.2%~12.3%,均低于 20%。

2.2.1.4 选择性 在某些试验条件下,基质中的一些成分能够抑制 ADA 与药物的结合进而产生假阴性的结果。同样,基质中的成分与药物结合也能够

产生假阳性结果。选择 10 个不同来源的空白食蟹猴血清配制含 200 ng · mL⁻¹ 阳性抗体的个体低浓度阳性质控及阴性对照样品。80% 的个体低浓度阳性质控样品与低浓度质控样品差异率介于 ±30%, 差异率范围为 -29.78%~ -15.58%, 且 90% 的阴性对照样品筛选为阴性。空白食蟹猴血清基质成分对 ADA 检测无明显影响。

2.2.1.5 耐药性 用空白食蟹猴血清稀释 RC18

表 2 CCP 验证结果
Tab. 2 Validation results of CCP

个体号 (individual)	抑制率(inhibition rate)/%					
	分析员 1 (analyst1)			分析员 2 (analyst2)		
	分析批 1 (batch 1)	分析批 2 (batch 2)	分析批 3 (batch 3)	分析批 1 (batch 1)	分析批 2 (batch 2)	分析批 3 (batch 3)
1	1.77	6.17	-0.25	3.79	9.49	2.29
2	4.35	9.17	0.39	1.02	13.33	3.26
3	15.32	12.65	2.24	10.67	0.79	9.61
4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	19.66	14.82	11.02	15.40	17.73	8.80
6	6.57	24.11	8.49	5.71	24.68	20.91
7	5.54	19.66	3.03	1.06	17.50	16.23
8	4.69	16.02	NA	2.75	21.89	10.97
9	6.11	17.25	2.56	4.29	19.73	5.15
10	1.20	4.36	-1.91	5.53	17.19	8.46
11	12.21	12.18	2.07	14.08	12.87	25.81
12	10.29	16.78	12.50	5.77	13.15	18.09
13	20.92	10.62	11.47	5.82	7.40	12.69
14	9.78	6.69	5.09	-2.72	13.17	4.51
15	9.33	9.06	-0.88	10.59	16.43	3.69
16	13.32	11.75	13.76	8.00	4.04	2.67
17	9.72	10.24	20.86	6.70	-4.41	2.77
18	11.11	10.79	16.67	0.80	-2.20	-6.20
19	3.98	2.63	14.70	2.83	17.25	2.92
20	10.82	6.55	5.00	8.58	13.30	10.41
21	3.65	4.71	1.62	5.72	15.64	3.08
22	4.27	1.47	-1.76	8.34	16.60	0.82
23	NA	NA	NA	NA	NA	NA
24	-3.03	8.63	-4.20	0.38	-12.23	NA
25	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26	-2.54	3.76	2.27	0.990	12.42	NA
均值(mean)/%	7.78	10.44	5.67	5.48	11.56	7.95
SD	6.16	5.75	6.91	4.50	8.96	7.57
CCP	22.14	23.85	21.76	15.96	32.44	25.59
CCP 均值(mean)	23.62					

注(note): NA 为超限值不再计算抑制率(NA was not involved in the inhibition rate calculation)

浓度至 50.0、15.0、5.0、1.50、0.50、0.15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 将其与 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的阳性对照抗体按照体积比 1:1 混合, 混合后于 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ (生化培养箱) 孵育 0.5 h, 作为耐药性考察样品。结果显示, 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阳性对照抗体的耐药限度为 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.1.6 灵敏度 在筛选试验过程中阳性抗体能够产生阳性响应的最低浓度认为是方法的灵敏度, 且该浓度在确证试验中证实需为阳性。用空白食蟹猴血清将阳性对照抗体稀释至表 3 所述系列浓度,

结果见表 3, 灵敏度为 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.1.7 Hook 效应 用空白食蟹猴血清将阳性对照抗体稀释至 6、30、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为 Hook 效应验证样本, Hook 效应样品经筛选应该为阳性, 结果显示未观察到明显的 Hook 效应。

2.2.2 竞争酶联免疫吸附法

2.2.2.1 SCP 选取 47 个空白食蟹猴血清作为 SCP 验证样本, 由 2 名分析员分别在 3 d 内运行 47 个 SCP 样本。结果如表 4 所示, 2 组数据均呈正态分布,

表 3 灵敏度验证结果(桥式酶联免疫吸附法)
Tab. 3 Validation results of sensitivity (bridging ELISA)

阳性抗体浓度 (concentration of positive antibodies)/(ng · mL ⁻¹)	加药前 S/N (S/N before dosing)	加药后 S/N (S/N after dosing)	抑制率 (inhibition rate)/%
6 400	29.529	1.228	95.84
3 200	29.678	1.064	96.41
1 600	29.948	0.981	96.72
800	27.929	0.948	96.61
400	19.442	0.940	95.17
200	10.458	0.883	91.56
100	5.974	0.890	85.10
50	3.634	0.912	74.90

SCP = S/N 均值 - 3.09 × SD, 3.09 为 99.9% 的正态分布临界值, 经统计食蟹猴样本针对 BAFF 和

APRIL 靶点的 NAb 的判定阈值 SCP 分别为 0.79 和 0.69。

表 4 针对 BAFF 及 APRIL 靶标 NAb 的 SCP 验证结果
Tab. 4 Validation SCP of NAb against BAFF and APRIL targets

S/N					
BAFF 靶标(BAFF target)[分析员 1(analyst 1)]			APRIL 靶标(APRIL target)[分析员 2(analyst 2)]		
分析批 1 (batch 1)	分析批 2 (batch 2)	分析批 3 (batch 3)	分析批 1 (batch 1)	分析批 2 (batch 2)	分析批 3 (batch 3)
0.94	0.96	0.87	0.90	0.96	0.89
0.93	0.95	0.89	0.94	0.95	0.98
0.86	0.96	0.84	0.87	0.96	0.90
0.98	0.95	0.91	0.91	1.01	0.88
0.91	0.95	0.92	0.95	1.13	0.90
0.94	0.96	0.97	0.94	1.21	0.92
0.91	1.06	0.97	0.88	1.37	0.89
0.89	0.95	0.96	0.89	1.09	0.97
0.92	0.90	0.85	0.92	1.05	0.82
0.97	0.94	0.90	0.99	1.12	0.91
0.95	0.98	0.92	0.94	1.12	0.95
0.99	0.94	0.96	0.96	1.02	0.88
1.03	1.02	0.84	1.00	1.14	1.05
0.93	0.93	0.96	0.94	1.29	1.11
0.93	0.99	0.96	0.97	1.10	1.03
1.00	0.90		1.03	0.95	
均值(mean)	0.94			0.97	
SD	0.05			0.09	
SCP	0.79			0.69	

2.2.2.2 耐药性 用空白食蟹猴血清以两倍梯度稀释 RC18 至浓度范围:10 000 ~ 39.06 ng · mL⁻¹, 与 1 000 ng · mL⁻¹和 2 000 ng · mL⁻¹的 Biotin - RC18 分别等比混合后, 上样前用含 3% BSA 的 DPBST

进行 1:9 稀释处理后加样进行测定。S/N 低于 0.79 和 0.69 的最低 RC18 浓度即为该方法能够耐受的最大药物浓度。结果显示, 针对 BAFF 和 APRIL 靶点的方法分别可耐受血清中浓度为

2 500和5 000 ng · mL⁻¹的 RC18。

2.2.2.3 灵敏度 用空白食蟹猴血清以两倍梯度稀释阳性对照抗体至浓度范围:5 000 ~ 78.13 ng · mL⁻¹, 与1 000 ng · mL⁻¹和2 000 ng · mL⁻¹的 Biotin - RC18按1:1混合,上样前用含3% BSA的DPBST进行1:9稀释处理。以样品浓度为横坐标,样本复孔的

吸收度均值为纵坐标,通过四参数拟合并提供阳性对照滴度曲线的相关参数。灵敏度以各分析批中阳性对照滴度曲线上低于0.79和0.69的最低浓度作为该方法灵敏度的上限范围。结果见表5,数据显示,针对BAFF和APRIL靶标的方法灵敏度均为312.50 ng · mL⁻¹。

表5 灵敏度验证结果(竞争酶联免疫吸附法)

Tab.5 Validation results of sensitivity(competitive ELISA)

阳性对照抗体浓度 (concentration of positive control antibody)/ (ng · mL ⁻¹)	S/N					
	BAFF 靶标(BAFF target)			APRIL 靶标(APRIL target)		
	分析批1 (batch 1)	分析批2 (batch 2)	分析批3 (batch 3)	分析批1 (batch 1)	分析批2 (batch 2)	分析批3 (batch 3)
5 000	0.27	0.28	0.27	0.17	0.32	0.12
2 500	0.32	0.32	0.33	0.16	0.33	0.12
1 250	0.40	0.39	0.38	0.16	0.38	0.14
625	0.49	0.44	0.49	0.20	0.43	0.34
312.50	0.61	0.58	0.58	0.45	0.49	0.42
156.25	0.82	0.80	0.89	0.72	0.72	0.69
78.13	0.93	0.93	0.91	0.86	0.88	0.82

3 讨论

生物技术药物的作用机制往往特异于病发中的某一特定靶点或机制,最大的优点是具有靶向性及高效性,不良反应发生率相对较低。但生物技术药物进入机体后可能产生较强的免疫原性,致敏免疫细胞产生ADA。ADA可能会影响药物的清除、血浆半衰期和组织分布,改变药效学及药代动力学特征,NAb可能通过与治疗性单克隆抗体药物的活性位点发生结合作用或者使活性位点的空间构象发生变化从而干扰药物的活性和生物学功能,进而对药物的毒理学研究造成影响,造成在非临床研究中观察到的效应可能并非药物真正的药理和/或毒性反应。

因此在评价药物安全性时需考察ADA及NAb是此类药物免疫性研究的通用标准,同时也是生物技术药物临床安全性评价的重要组成部分。在检测方法上,基于受体-配体结合的ADA检测分为直接法和间接法。与直接分析法相比,本研究建立的桥式酶联免疫吸附法和竞争酶联免疫吸附法都具有较高的灵敏度及耐药性等特征,故不失为泰它西普免疫原性检测的理想方法。由于受试药物浓度远远高于方法的耐药性,这些药物可能会中和ADA,使其在血清中以结合物的形式存在,干扰实际检测,因此在

样本处理上采用了酸处理血清样品的方式,可以使样品中的ADA和药物的结合物分离开,进而使得ADA检测不受干扰^[8]。在计算处理数据上,采用S/N方式处理数据,可以有效的减少实验批次之间仪器响应值浮动对数据的影响。

虽然临床前ADA测定并不能完全预测受试药物的免疫原性,但对安全性评价中药物毒性作用和剂量关系的分析,毒代动力学结果的解释非常关键。在非临床药代动力学、药理和毒理研究中评价免疫原性有助于对研究结果作出更加合理的解释,是生物药申报临床试验的重要内容;同时在药物临床试验阶段,进行免疫原性检测已是公认的评价指标之一,以生物大分子检测指导原则为参考,免疫原性的检测方法及要求得到不断完善^[9]。

4 结论

本研究建立了食蟹猴血清中ADA浓度检测的桥式酶联免疫吸附法及ADA阳性样本中的NAb浓度检测的竞争酶联免疫吸附法,并进行系统的方法学评估,通过筛选确证实验经分层比较,可确认ADA阳性样本,消除假阳性样品,同时对确认阳性样品进行NAb检测,判断ADA阳性样本是否存在功能域为BAFF或APRIL的NAb。两方法都具有操作简便,检

测范围较广,方法特异性好,且不受实验动物种属的影响优点,可应用于重复给药毒性试验中食蟹猴样本的 ADA 浓度及 ADA 阳性样本中的 NAb 浓度检测^[10-16]。本研究方法的考察验证项目符合目前临床前生物制品免疫原性研究的要求,为其他生物制剂类药物的免疫原性分析提供参考和借鉴。

参考文献

- [1] 张莹莹,王世颖,束庆,等. 靶向 B 淋巴细胞治疗系统性红斑狼疮的生物制剂: 贝利尤单抗与泰它西普[J]. 中南药学, 2022,20(10):2356
ZHANG YY, WANG SY, SHU Q, *et al.* B-lymphocyte-targeted biologics for systemic lupus erythematosus: belimumab and telitacicept [J]. *Cent South Pharm*, 2022, 20(10): 2356
- [2] 王慧敏,闻镍,王晓霞,等. 蛋白多肽类药物和单抗药物免疫原性评价方法及研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2021, 16(3):251
WANG HM, WEN N, WANG XX, *et al.* Immunogenicity evaluation methods and research progress of protein polypeptides and monoclonal antibodies [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2021, 16(3):251
- [3] 车津晶,李娜. 生物类似药临床免疫原性相似性评价生物分析方法的一般考虑[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(7):721
CHE JJ, LI N. General considerations on bioanalytical methods for comparative evaluation of biosimilars immunogenicity [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2021, 26(7):721
- [4] 宋文姬,石远凯,韩晓红. 单克隆抗体类药物的免疫原性分析[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(21):2462
SONG WY, SHI YK, HAN XH. Immunogenicity analysis of monoclonal antibody drugs [J]. *Chin J New Drug*, 2016, 25(21): 2462
- [5] 郑逢佳,贾志君,谢新遥,等. 抗体类药物的生物分析方法研究概况[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(2):227
ZHENG FJ, JIA ZJ, XIE XY, *et al.* A survey of bioanalysis methods for antibody drugs [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2020, 25(2):227
- [6] 王海学,陆国才,张子腾,等. 生物类似药的免疫原性研究与评价技术思考[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(6):483
WANG HX, LU GC, ZHANG ZT, *et al.* Technical considerations on the study and evaluation of the biosimilars' immunogenicity [J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(6):483
- [7] 官新江,满素勤,邵雪,等. 抗体药物偶联物抗药抗体中和活性分析研究进展[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(21):2573
GONG XJ, MAN SQ, SHAO X, *et al.* Advance on neutralizing activity analysis of anti-drug-antibody for antibody-drug conjugates [J]. *Chin J New Drug*, 2019, 28(21):2573
- [8] 高柳村,李黎,王绪甲,等. ELISA 法测定食蟹猴血清中抗 BLYS 抗体的抗药抗体[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(1):50
GAO LC, LI L, WANG XJ, *et al.* Detection of anti-drug antibody against anti-BLYS antibody in cynomolgus monkey by ELISA [J]. *Chin J New Drug*, 2016, 25(1):50
- [9] 杨淑涵,刘丽,李波. 多结构域治疗性蛋白药物的非临床免疫原性评价[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(21):2152
YANG SH, LIU L, LI B, *et al.* Non-clinical immunogenicity assessment for multi-domain biotherapeutics [J]. *Chin J New Drug*, 2022, 31(21):2152
- [10] 李青莲,王斌,徐楠楠,等. ELISA 法定量测定食蟹猴血清中的抗 CTLA-4 单克隆抗体[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(7):1209
LI QL, WANG B, XU NN, *et al.* Development of an enzyme linked immunosorbent assay method for the determination of recombinant anti CTLA-4 monoclonal antibody in Cynomolgus monkey serum [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(7):1209
- [11] 杨丽萍,王凌,刘志浩,等. 抗体偶联药物(RC48)在食蟹猴中抗药性抗体检测方法的建立与验证[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(6):639
YANG LP, WANG L, LIU ZH, *et al.* Development and validation of a method for detecting anti-RC48 antibody in cynomolgus monkey serum [J]. *Chin J New Drug*, 2016, 25(6):639
- [12] 王变珍,邓承莲,邹佳,等. 酸解桥式酶联免疫吸附分析法对食蟹猴血清中治疗性单克隆抗体奥法木单抗的免疫原性研究[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(1):14
WANG BZ, DENG CL, ZHOU J, *et al.* An acid dissociation bridging elisa assay for detection of antibodies against therapeutic monoclonal antibody ArzerraTM in cynomolgus serum [J]. *Chin Pharm J*, 2017, 52(1):14
- [13] 高妍,徐楠楠,汪宁,等. ELISA 法测定食蟹猴血清中抗 PD-1 单克隆抗体浓度[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(4):666
GAO Y, XU NN, WANG L, *et al.* Determination of anti-PD-1 monoclonal antibody in cynomolgus monkeys serum by ELISA method [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(4):666
- [14] 彭嘉宝,彭纛. ELISA 法测定大鼠血浆中抗体偶联药物浓度及药代动力学研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(6):1037
PENG JB, PENG Y. Determination of antibody-drug conjugate in rat plasma by ELISA and study of its pharmacokinetics [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(6):1037
- [15] 陈红霞,李雪,罗涛,等. 重组人源化抗 TNF- α 单抗 WLB303 猴重复给药毒性试验血清中和抗体确证方法的建立[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(20):2386
CHEN HX, LI X, LUO T, *et al.* Development of a method for detection of serum neutralizing antibodies in cynomolgus monkeys undergoing repeated dose toxicity study of humanized anti-TNF- α monoclonal antibody WLB303 [J]. *Chin J New Drug*, 2017, 26(20):2386
- [16] BIVI N, SWEARINGEN CA, SHOCKLEY TE, *et al.* Development and validation of a novel immunogenicity assay to detect anti-drug and anti-PEG antibodies simultaneously with high sensitivity [J]. *J Immunol Methods*, 2020, 486:112856

(本文于 2023 年 2 月 24 日收到)