

抗重组人血清白蛋白抗体的检测方法建立及验证

杨淑涵¹, 刘海涌², 贾向阳², 刘 丽¹, 王 平³, 李曙芳⁴, 潘东升¹, 李 波¹

(1 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176; 2 北京新艾进生物科技有限公司, 北京 100176; 3 深圳普罗吉医药科技有限公司, 深圳 518048; 4 药物毒理与放射损伤药物山西省重点实验室, 中国辐射防护研究院, 太原 030006)

[摘要] **目的:** 药物耐受以及内源性交叉反应是影响抗药抗体检测的主要因素, 因此建立能够耐受较高药物浓度且可避免内源性交叉反应的检测方法是抗药抗体分析中需要解决的主要问题。本研究目的是建立抗重组人血清白蛋白抗体的检测方法并进行验证。**方法:** 通过酸化及纳米磁珠富集提取抗重组人血清白蛋白抗体, 然后采用桥连法进行抗体检测, 最后对建立的方法进行验证。**结果:** 经过该方法处理后, 抗体回收率 > 80%, 方法灵敏度可达到 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 批间精密度和批内精密度均 < 20%, 该方法最高可耐受 $2 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药物。**结论:** 本研究建立了抗重组人血清白蛋白抗体检测方法, 该方法抗体回收率高, 具有良好的灵敏度和精密度, 可达到 mg 级耐药, 且可有效去除内源性物质干扰, 既可用于抗药抗体检测, 也可用于抗体药物提取, 进而用于药动学分析。

[关键词] 抗药抗体; 耐药性; 交叉反应; 血清白蛋白; 富集提取

[中图分类号] R927.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)18-1866-08

Establishment and verification of a method for detection of anti-drug antibody against recombinant human serum albumin

YANG Shu-han¹, LIU Hai-yong², JIA Xiang-yang², LIU Li¹, WANG Ping³,
LI Shu-fang⁴, PAN Dong-sheng¹, LI Bo¹

(1 Beijing Key Laboratory of Non-clinical Safety Evaluation of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2 Beijing Xinaijin Biotechnology Company, Beijing 100176, China; 3 Shenzhen Protgen Ltd., Shenzhen 518048, China; 4 Shanxi Key Laboratory of Drug Toxicology and Drug for Radiation Injury, China Institute for Radiation Protection Research, Taiyuan 030006, China)

[Abstract] **Objective:** Drug resistance and endogenous cross-reactivity are the main factors affecting the detection of anti-drug antibody (ADA), so the establishment of method that can tolerate higher drug concentration and avoid endogenous cross-reactivity is a major problem to be solved in immunogenicity analysis. The aim of this study was to establish and verify a method for detection of ADA against recombinant human serum albumin (rHSA). **Methods:** Anti-rHSA antibody was extracted by acidification and enrichment with magnetic nanobeads and then detected using a bridging method. Finally, the established method was validated. **Results:** The recovery of the antibody was greater than 80% by using the established method. The sensitivity of the method could reach $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the intra- and inter-batch RSDs were less than 20%. In addition, the method could resist drug of up to $2 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. **Conclusion:** This study established a method for the detection of anti-rHSA antibody. The method has high antibody recovery and good performances of sensitivity and precision. It can also achieve mg-level drug-

[基金项目] 中国辐射防护研究院自主科研项目平台开放基金(CIRP-DTRI20220201)

[作者简介] 杨淑涵, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物非临床安全性评价。联系电话: (010)67872233-8220, E-mail: y17519285630@163.com。

刘海涌, 男, 博士研究生, 主要从事新药免疫原性评价研究, 联系电话: (010)59755520, E-mail: sssqing@163.com。

[通讯作者] 潘东升, 女, 博士研究生, 主要从事药物非临床安全性评价研究。联系电话: (010)67876252, E-mail: pandongsheng@nifdc.org.cn。

李波, 男, 博士生导师, 主要从事药物非临床安全性评价研究。联系电话: (010)53851706, E-mail: libo@nifdc.org.cn。

resistance and effectively remove the interference of endogenous substances, which can be applied for the detection of ADA, extraction of antibody drugs and further analysis of drug metabolism.

[Key words] anti-drug antibody; drug resistance; cross reactions; serum albumin; enrichment and extraction

人血白蛋白(human serum albumin, HSA)主要生理功能是扩充血容量和维持血浆胶体渗透压,还具有载体及维持毛细血管完整性等功能,临床广泛用于治疗多种疾病。由于人血浆短缺,以及对血液制品安全性的考虑,HSA供应始终处于紧张状态。重组人血清白蛋白(recombinant human serum albumin, rHSA)是经重组DNA技术表达的重组蛋白,因来源方便且不含动物源性成分,被认为是一种可用于治疗的无病原体的HSA替代品^[1]。这类产品进行免疫原性评价时需要考虑交叉反应^[2],即生物技术药物诱导机体产生的抗药抗体(anti-drug antibody, ADA)会与机体内本身存在着的与药物有着相同表位的物质发生抗原抗体反应,多见于治疗性蛋白等产品,如本文中的rHSA给予食蟹猴后诱导其产生猴源的抗rHSA抗体,而该抗体除了与药物rHSA结合外,还会与猴体内本身存在着的白蛋白结合。

针对游离药物干扰和内源性物质对ADA检测的干扰问题,研究者们一直在对检测方法进行优化,如在检测前对样本进行前处理,应用分离和纯化技术将分析中的干扰因素进行分离。样本的前处理方法包括单纯的酸解离法、特异性抗体饱和检测体系中的游离药物以及药物靶标法、亲和捕获洗脱法(ACE)^[3]、酸解离固相萃取法(SPEAD)^[4]、沉淀和酸解法(Pand A)^[5]以及生物素化药物提取和酸解离法(BEAD)^[6-7]等,这些样本前处理方法可减轻桥接法对类风湿因子、抗同种异型抗体、异体抗体和药物靶点(与单克隆抗体类药物结合的内源性物质)等物质引起假阳性干扰的耐受性,同时也可减少血清样本中药物自身的假阴性干扰^[8-10]。ADA检测方法的耐药水平要求达到2次给药间隔中药物谷浓度,因治疗目的的特殊性,HSA在临床上的给药剂量通常很高,导致循环中存在大量游离药物,这对现有检测方法的耐药性是一个严重的挑战;同时HSA与食蟹猴白蛋白具有较高的同源性,导致抗rHSA抗体可与食蟹猴白蛋白产生严重交叉反应,严重影响抗rHSA抗体的检出。

为了评价rHSA在食蟹猴体内的免疫原性特征,本研究旨在建立能够检测食蟹猴血清中抗rHSA抗体的方法。分别使用酶联免疫吸附法(Elisa)和

MSD桥联法(结合Pand A和SPEAD样本前处理方法)检测食蟹猴血清中抗rHSA抗体,因内源性白蛋白干扰导致假阴性结果,且不能达到相应灵敏度。本研究开发了一种新方法,该方法对于去除内源性蛋白干扰以及药物耐受具有良好的效果,成功地检测了食蟹猴血清中抗rHSA抗体。

材料和方法

1 药物与试剂

rHSA(分子量:66 438.21 Da,深圳普罗吉医药科技有限公司,批号:A201908N002,浓度:200 mg·mL⁻¹);阳性对照Anti-Serum Albumin Antibody(货号:68001-MM06,以下以MM06表示,中国Sino Biological公司);MSD Gold sulfo-Tag NHS-Ester(货号:R91AO-1,美国MSD公司);EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin(货号:A35358,美国Thermo Fisher公司);链霉亲和素(streptavidin,SA)磁珠(德国Roche公司,货号:11641778001);N-(4-氨基基)-N-乙基异鲁米诺(ABEI,美国Sigma-Aldrich公司,货号:A0156);SA磁珠(北京新艾进生物科技有限公司,批号:20210806),rHSA分离磁珠(北京新艾进生物科技有限公司,批号:20210806)。

2 仪器

Spectra Max-Plus 384 酶标仪(美国Molecular Devices公司);SQ120 电化学发光生物分析仪(美国MSD公司);Rightflare 60 全自动分子发光生物免疫分析仪(北京新艾进生物科技有限公司)。

3 食蟹猴白蛋白对ADA检测的干扰

采用Elisa法评价食蟹猴血清中白蛋白对ADA检测的干扰。用杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)将MM06稀释后被包被于酶标板,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗涤后封闭,37℃孵育1h。然后加入10%猴血清稀释的rHSA,37℃孵育1h。洗涤后加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的检测抗体,37℃孵育1h。洗涤后加入TMB显色,37℃避光显色10min,加入终止液后读取OD值。

4 Pand A方法

参照Zoghbi等^[5]的Pand A方法检测食蟹猴血清中抗rHSA抗体,主要步骤为:10 μL的MM06(10%

猴混合血清稀释为 10 000, 2 000, 400, 0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、80 μL 的 rHSA (PBS 稀释为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 10 μL 7% ~ 8% 的聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG; PBS 稀释和 H_2O 稀释) 充分混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ \times 30 min) 后弃上清, 3.5% PEG 重悬沉淀, 洗涤 1 次, 再次离心。加入 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸后室温震荡孵育 20 min。将 40 μL 酸化样本和 10 μL 的 Tris 碱包被在 MSD 标准板上 (Multi-array 96-well plate, Standard, 货号: L15XA-3, 美国 MSD 公司), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭, 室温震荡孵育 1 h。PBST 洗涤后加入 Sulf-Tag 标记的 rHSA, 室温下震荡孵育 1 h。PBST 洗涤后加入 Read Buffer 读板。

5 BEAD 方法

参照 Niu 等^[9] 的 BEAD 方法检测食蟹猴血清中抗 rHSA 抗体, 主要步骤为: 10 μL 的 MM06 (10% 猴混合血清稀释为 10 000, 2 000, 400, 0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与 90 μL 醋酸充分混合, 室温下震荡孵育 20 min。10 μL 酸化样本、10 μL 的 20% Tris 碱和 80 μL 的 Biotin-rHSA (125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1% BSA 配制) 加入 96 孔板中, 室温下震荡孵育过夜。每孔加入 100 μL 的 SA 磁珠 (浓度: 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, K_2HPO_4 配制), 室温下震荡孵育 1 h。 K_2HPO_4 洗涤磁珠 3 次。弃上清后每孔加入 50 μL 醋酸, 室温下震荡孵育 20 min。取 25 μL 的酸化样本与 50 μL 的 Master Mix (Biotin-rHSA: 0.44 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 20% Tris; Sulf-Tag-rHSA: 0.88 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 20% Tris) 混合, 室温震荡孵育 1 h。3% BSA 封闭 SA 板 (MSD Gold 96-well Streptavidin Plate, 美国 MSD 公司, 货号: L15SA-1), 室温震荡孵育 1 h, PBST 洗板 3 次, 拍干; 加入 50 μL 上述样本, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗板 3 次, 加入 Read Buffer 后读板。

6 纳米磁珠法

该方法使用纳米磁珠分离血清中的 ADA, 用于后续检测, 主要步骤为: 15 μL 待测样本与 15 μL 样品保护酸化液 (0.5% NP40 + 1% COOH-BSA + 2.13% MES) 涡旋混匀, 室温静置 30 min。加入 200 μL 的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸, 涡旋混匀, 室温静置 20 min。加入 30 μL 的 1% rHSA 分离磁珠 [用 1-乙基-(3-二甲氨基丙基) 碳酰二亚胺 (EDC) 一步法制备 rHSA 标记磁珠, EDC 浓度 1%] 和 50 μL 中和液, 涡旋, 60 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ \times 40 min。磁棒吸附磁珠, 10 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ \times 3 min。更换深孔板, 每孔加入 900 μL 洗液, 90 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ \times

6 min。磁棒吸附磁珠, 10 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ \times 3 min。更换深孔板, 每孔加入 310 μL 的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸, 90 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ \times 8 min。磁棒吸附磁珠, 10 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ \times 14 min。取 55 μL 混合液 [Biotin-rHSA (用 NHS-biotin 制备 rHSA-biotin, biotin 与 rHSA 分子数比 10:1) 和 ABEI-rHSA 混合物 (用 EDC 一步法制备 ABEI-rHSA 结合物, EDC 用量 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)] 与 50 μL 中和液室温反应 10 min, 然后加入 200 μL 的酸化样本, 室温静置反应 20 min。100 μL 上述样本和 20 μL 的 SA 磁珠孵育 5 min 在全自动分子发光生物免疫分析仪上进行检测。

结 果

1 食蟹猴白蛋白对 ADA 检测的干扰

rHSA 用 10% 猴血清稀释后, rHSA 加标浓度为 0 时, 检测浓度为 11.79 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, rHSA 添加浓度为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 检测浓度为 16.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (回收率为 80.50%), 详见表 1; 提示 MM06 与猴血清中的白蛋白产生交叉反应进而产生阳性信号, 血清 rHSA 加标浓度需 $>20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 该检查方法才会受到较小的内源性交叉反应干扰。

表 1 食蟹猴血清白蛋白对 ADA 检测的干扰

rHSA 加标浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	rHSA 回算浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率 /%
50	49.97	99.94
20	16.10	80.50
5	11.52	230.46
1	11.79	1 179.20
0.2	11.01	5 504.50
0.05	6.56	13 120.00
0	11.79	—

包被抗体为 MM06, 1:2 000 稀释

2 Pand A 和 BEAD 分析方法比较

2.1 Pand A 方法 分别用去离子水和 PBS 溶解 PEG 6000, 浓度设置为 7% 和 8%。7% 的 PEG 产生的相对光单位 (RLU) 信号较高, 在 ADA 加标浓度为 400 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 7% PEG (PBS 配制) 可产生最佳信噪比 (SNR), 见表 2。该方法同时使用 1% BSA 配制的 MM06 作为质控进行检测, 质控样本不经样本前处理, 直接使用桥联法进行检测。结果显示, 质控样本信号值显著高于 10% 猴血清配制的阳性对照, 说明该方法不能消除猴血清中白蛋白的干扰。

表2 Pand A 方法检测结果

ADA 的 10% 血清 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	PEG 水溶液				PEG PBS 溶液				ADA 的 1% BSA 溶液 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	无 PEG 处方	
	7%		8%		7%		8%			RLU	SNR
	RLU	SNR	RLU	SNR	RLU	SNR	RLU	SNR			
10 000	1 188	4.77	856	2.93	1 137	4.99	923	2.38	100	3 286	9.50
2 000	412	1.65	348	1.40	569	2.50	490	1.26	20	786	2.27
400	338	1.36	214	0.86	320	1.40	427	1.10	4	376	1.09
0	249	1.00	292	1.17	228	1.00	388	1.00	0	346	1.00

SNR = $\text{RLU}_{\text{验证样本}} / \text{RLU}_{\text{对照样本}}$ 均值

2.2 BEAD 方法 使用该方法进行 ADA 检测时,整体信号水平较低,在 MM06 加标浓度为 $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,SNR 值为 1.26,方法灵敏度小于 Pand A 法,结果见表 3。

3 纳米磁珠提取结合桥连法

该方法在 BEAD 方法上进一步进行优化,同时在酸解液和 ADA 提取上进一步进行优化,方法示意

图见图 1。

表3 BEAD 方法检测结果

ADA 的 10% 混合血清/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	RLU	均值	SNR
10 000	291 264	277.5	2.08
2 000	174 285	229.5	1.72
400	159 177	168.0	1.26
0	134 133	133.5	

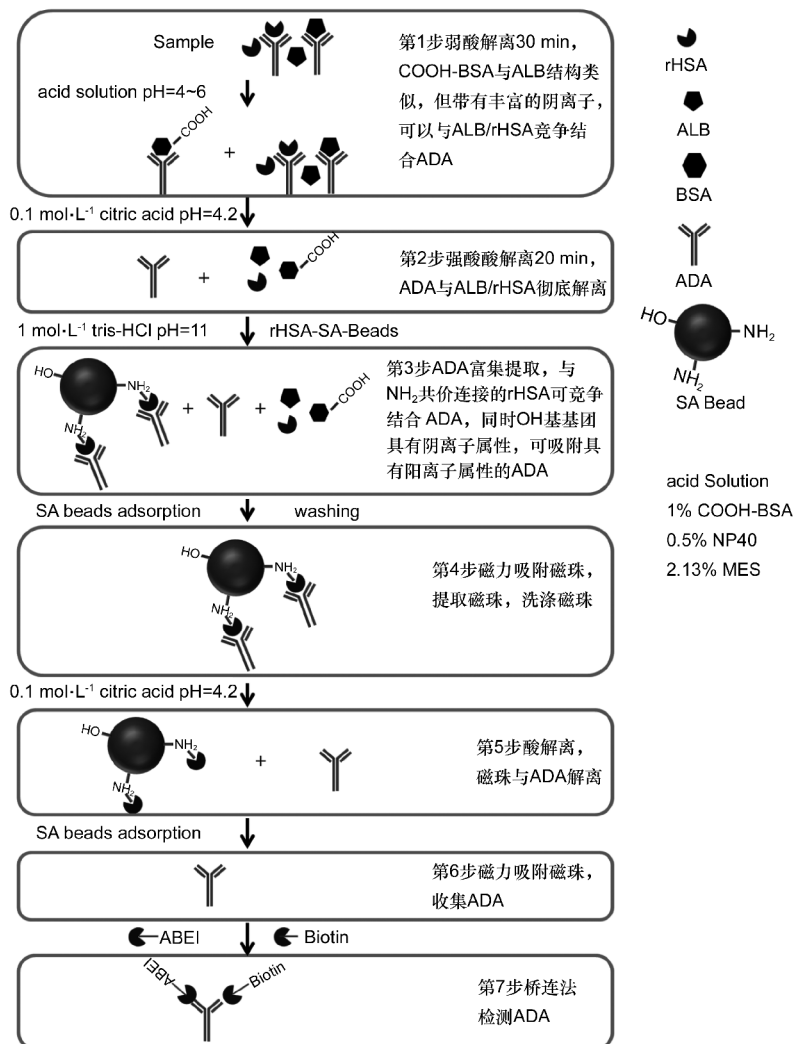


图1 纳米磁珠提取结合桥连法示意图

3.1 ADA 提取效率评价 采用 ADA 加标法进行回收率评价,比较经过 ADA 提取和未经过 ADA 提取 2 种方法的检测结果,不经过提取的操作流程是 ADA 样本[混合猴血清配制的 MM06,分别以筛选低值质控(L-QC)和筛选高值质控(H-QC)表示]经过酸化后采用桥联法进行检测,经过提取的操作流程见方法 4。检测结果显示,经过纳米磁珠提取的样本回收率为 81%~86%,见表 4。

表 4 纳米磁珠法 ADA 提取效率

样品	RLU(经过提取)	RLU(不经过提取)	回收率/%
NC1	308	297.5	
NC2	319.5	291.0	
NC3	317.5	278.5	
L-QC1	704.5	587.5	83.39
L-QC2	702.5	594.5	84.63
L-QC3	742	601.5	81.06
H-QC1	3 802	3 149.5	82.84
H-QC2	3 724	3 199.0	85.90
H-QC3	3 772.5	3 106.0	82.33

NC:混合猴血清; L-QC:MM06 ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); H-QC:MM06 ($4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);回收率 = RLU(不经过提取)/RLU(经过提取) $\times 100\%$

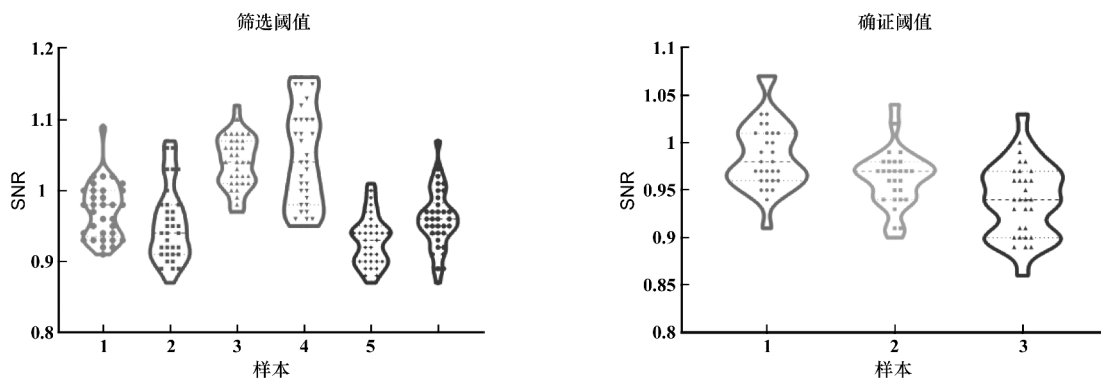


图 2 纳米磁珠提取结合桥连法检测血清 ADA 的数据正态分布图

3.3 灵敏度和选择性 用加标法来评价该方法的灵敏度,以食蟹猴血清为基质稀释 MM06,起始浓度为 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,以 2 倍梯度稀释 7 个浓度,将阳性对照产生阳性响应的最低浓度定义为方法灵敏度。最小稀释度样本 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 ADA 的 SNR 值为 1.27,大于筛选实验阈值,故将 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 定义为该方法的灵敏度。

选择性主要考察检测方法受基质或其他因素的干扰。20 个空白食蟹猴样本(加标 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MM 06 和不加标)在一个分析批内运行,计算差异

3.2 筛选实验阈值和确证实验阈值 为了避免干扰因素对分析批测定结果的影响,采用 SNR 替代 RLU 进行结果处理, $\text{SNR} = \text{RLU}_{\text{验证样本}} / \text{RLU}_{\text{对照样本}}$ 均值。

取食蟹猴空白血清 36 个建立筛选实验阈值,由 2 名实验人员在 6 个分析批内完成测定,首先对每个分析批中 36 个检测结果进行正态分布检验,剔除离群值后采用参数法计算筛选实验阈值,假阳性率控制在 5%,筛选实验阈值为 1.06。

取食蟹猴空白血清 31 个作为筛选样本,用混合猴血清将 rHSA 稀释至 $5 000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,继续用筛选样本稀释至 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,作为确证样本。在 3 个分析批中运行筛选样本和确证样本。首先对每个分析批的检测结果进行正态分布检验,剔除离群值后,采用参数法计算确证实验阈值,假阳性率控制在 1%,确证实验阈值抑制率为 12.15%。详见图 2。

率。要求至少 80% 的选择性样本的 SNR 值大于筛选实验阈值,差异率介于 $\pm (20\% \sim 30\%)$ 认为可接受。

差异率/% = $(\text{SNR}_{\text{筛选阈值}} - \text{SNR}_{\text{L-QC 均值}}) / \text{SNR}_{\text{L-QC 均值}} \times 100\%$

检测结果显示,加标样本 SNR 值均大于筛选实验阈值,19 个(95%)未加标样本 SNR 值均小于筛选实验阈值;加标样本和 L-QC 之间的差异率介于 $-19.38\% \sim 4.20\%$,表明该方法不受血清基质干扰,详见图 3。

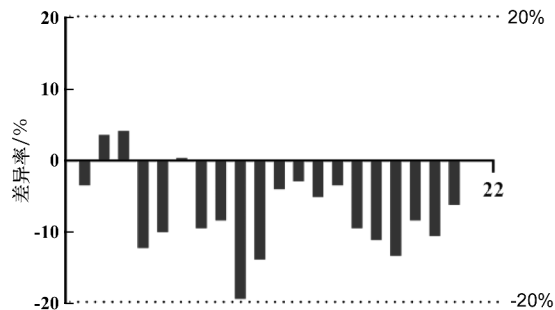
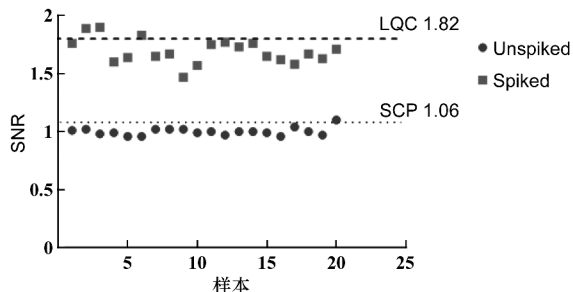


图3 纳米磁珠提取结合桥连法的选择性

3.4 耐药性 用阳性对照 MM06 评价该检测方法对药物的耐受性。先用混合猴血清将 rHSA 稀释为 4 和 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 将 MM06 稀释为 $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 二者等体积混合后室温孵育 1 h。检测结果中 SNR 值大于筛选实验阈值的最高药物浓度即为药物耐受限度。当猴血清中 ADA 浓度为 $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, rHSA 最高添加浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 耐药样本的 SNR 大于筛选阈值, 见表 5。

3.5 精密度 使用 H-QC ($\text{MM06}, 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、L-QC ($\text{MM06}, 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和混合空白食蟹猴血清 (NC) 考察批内和批间精密度, 判定标准为批内和批

间精密度 $\text{CV}(\%) \leq 20\%$ 。NC 和质控样本的批内精密度均 $< 20\%$, NC 的批间精密度为 4.35%, H-QC 和 L-QC 批间精密度分别为 12.02% 和 10.39%。详见图 4。

表5 耐药性验证结果

ADA/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	rHSA/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	SNR
500	1	1.29
500	2	1.18

筛选阈值 = 1.06

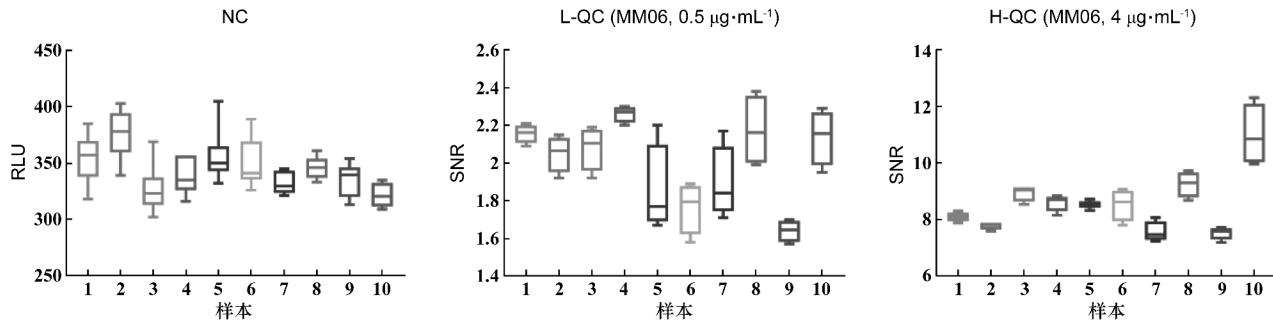


图4 纳米磁珠提取结合桥连法的精密度

讨论

生物制品因其潜在的免疫原性反应对安全性和有效性均产生显著影响, ADA 通常在给药后短期内产生, 严重时因可与内源性蛋白发生交叉反应而致命。rHSA 是经过重组 DNA 技术表达的人白蛋白, 本研究为 rHSA 非临床安全性评价研究, 以食蟹猴为研究对象, 食蟹猴白蛋白与人血清白蛋白的同源性为 93.7% (使用 Uniprot 和 NCBI 进行蛋白序列比对, <https://www.uniprot.org/blast/uniprotkb/ncbiblast-R20230111-100147-0171-62680112-p2m/o->

view; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>), 与 rHSA 的同源性接近 97%, 故 rHSA 可能作为一种异体蛋白而导致免疫反应, 产生 ADA。本研究中 rHSA 最高给药剂量为 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 且多次给药, 循环中较高游离药物会干扰 ADA 的检测^[10-11]。同时因 rHSA 与猴白蛋白同源性较高, ADA 很可能与猴白蛋白结合产生交叉反应。本研究前期药物代谢分析中发现, 食蟹猴血清中的白蛋白严重干扰抗 rHSA 抗体检测。所以本研究最大的问题是待测样本中药物 rHSA 和食蟹猴白蛋白干扰 ADA 的检测。

为了解决干扰, 本研究使用 Pand A 和 BEAD 方

法对待测样本进行前处理,提取 ADA 进行下一步检测。Pand A 是将 PEG 沉淀与 ACE 结合的方法,该方法对检测过程中生物基质干扰有一定限度的抵抗作用。本研究使用该方法进行抗 rHSA 抗体检测时,发现该方法存在回收率低的问题,因 PEG 沉淀物(抗原抗体-PEG 复合物)不显著,在使用平底或者 U 底板进行沉淀后弃上清时极易将沉淀物弃掉,导致 ADA 回收率不一致,影响检测结果。根据本次检测结果,经过 PEG 沉淀处理后,MM06 加标浓度为 $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,其信号值为 320(7% PEG, PBS 配制);而不经 PEG 沉淀处理,MM06(经 1% BSA 稀释)加标浓度为 $4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,其信号值为 376,结果显示在阳性对照浓度增加 100 倍后,信号值无增加。MM06 与 Sulf-Tag 标记的 rHSA 结合后可产生信号,如果 MM06 与基质中的猴白蛋白结合则不产生信号,该方法中 MM06 加标浓度增加后,信号值未增加,提示食蟹猴血清中内源性白蛋白的干扰 MM06 的检出。另 Zoghbi 等^[5]报道,PEG 沉淀作用无特异性,在沉淀 ADA 的同时对血清中白蛋白、球蛋白以及药物特异的 ADA 均有沉淀作用;且 PEG 不同批次间结果差异很大^[5];所以需要采用其他方法检测抗 rHSA 抗体。

BEAD 方法是在 ACE 方法上结合了 SA 磁珠吸附法对 ADA 进行提取。该方法主要用于消除交叉反应的干扰,如重组人胰岛素样生长因子 1,在血清中有多种可与其结合的物质,存在交叉反应。本研究中,经 BEAD 方法处理后,检测结果显著低于 Pand A 的结果, $10\,000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (经 10% 混合猴血清稀释)的 MM06 经过 BEAD 处理后,其信号值为 227.5,而经过 7% PEG(PBS 配制)处理后,其信号值为 1 137,是前者的 4 倍。信号的显著降低说明该方法同样不能耐受猴血清中白蛋白的干扰,需继续摸索新的检测方法。

纳米磁珠提取法是在 BEAD 方法基础上进行优化,主要根据 ADA 与食蟹猴白蛋白交叉反应的特点,配制特定酸解溶液及纳米分离磁珠,将 ADA 与 rHSA 和食蟹猴白蛋白解离,进一步富集提取 ADA 用于检测。在该提取过程中,第 1 步是弱酸解离,在弱酸环境中、在非离子型表面活性剂存在情况下,酸解离作用较为温和,主要用于打开 ADA 与猴白蛋白的结合。二者解离后,羧基化的 BSA 与猴白蛋白结构类似,但含有丰富阴离子,对于带阳离子 ADA 的结合能力比猴白蛋白强,可竞争结合 ADA。第 2 步

采用短时的强酸解离,可进一步解离 ADA 与 rHSA 的结合。通过 2 步酸解,达到 ADA 与猴白蛋白和 rHSA 完全解离,但因使用弱酸解离液,即可达到解离效果,又使得解离效果较为温和,可使 ADA 保持较好活性。

纳米磁珠磁阵排布和磁力强度的设计更适合蛋白提取,采用特制耐酸型超顺磁纳米粒子,且比表面积巨大。纳米磁珠连接有氨基和羟基基团,氨基基团与 rHSA 共价连接后,可以和溶液体系中的 rHSA、猴白蛋白竞争结合 ADA。同时纳米磁珠上的羟基基团具有阴离子属性,可吸引具有阳离子属性的 ADA 向磁珠聚集,更利于 ADA 富集。通过比较普通酸化和纳米磁珠富集的 ADA 提取效率发现,经过纳米磁珠富集提取后,ADA 回收率可达 80% 以上,可以满足临床前 ADA 检测需求。该方法在耐药性方面表现良好,可达 mg 级耐药水平,这对于治疗性蛋白制品或者单克隆抗体来说尤为重要,因为这类生物药物往往给药剂量较高^[12],且药物半衰期长,所以循环中游离药物浓度较高,会严重干扰 ADA 检测。

综上所述,本研究开发并优化了一种有效去除内源性物质干扰的方法,该方法经过验证,具有良好的灵敏度,可耐受 mg 级的药物浓度。使用该方法本研究成功实现了食蟹猴血清中抗 rHSA 抗体的检测。根据该方法的实验原理,该方法不仅可以用于 ADA 的检测,也可以用于抗体药物提取,进而用于药物代谢分析。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN Z, HE Y, SHI B, *et al.* Human serum albumin from recombinant DNA technology: challenges and strategies[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(12): 5515 - 5525.
- [2] LI J, YANG C, XIA Y, *et al.* Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin[J]. *Blood*, 2001, 98(12): 3241 - 3248.
- [3] BOURDAGE JS, COOK CA, FARRINGTON DL, *et al.* An Affinity Capture Elution (ACE) assay for detection of anti-drug antibody to monoclonal antibody therapeutics in the presence of high levels of drug[J]. *J Immunol Methods*, 2007, 327(1 - 2): 10 - 17.
- [4] SMITH HW, BUTTERFIELD A, SUN DQ. Detection of antibodies against therapeutic proteins in the presence of residual therapeutic protein using a solid-phase extraction with acid dissociation (SPEAD) sample treatment prior to ELISA[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2007, 49(3): 230 - 237.
- [5] ZOGHBI J, XU YX, GRABERT R, *et al.* A breakthrough novel method to resolve the drug and target interference problem in immunogenicity assays[J]. *J Immunol Methods*, 2015, 426: 62 - 69.

- [6] LOFGREN JA, WALA I, KOREN E, *et al.* Detection of neutralizing anti-therapeutic protein antibodies in serum or plasma samples containing high levels of the therapeutic protein[J]. *J Immunol Methods*, 2006, 308(1-2): 101-108.
- [7] XU WF, JIANG H, TITSCH C, *et al.* Development and characterization of a pre-treatment procedure to eliminate human monoclonal antibody therapeutic drug and matrix interference in cell-based functional neutralizing antibody assays[J]. *J Immunol Methods*, 2015, 416: 94-104.
- [8] BIAN SM, DRESEN E, TANG HT, *et al.* Antibodies toward vedolizumab appear from the first infusion onward and disappear over time[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017, 23(12): 2202-2208.
- [9] NIU HM, KLEM T, YANG JS, *et al.* A biotin-drug extraction and acid dissociation (BEAD) procedure to eliminate matrix and drug interference in a protein complex anti-drug antibody (ADA) isotype specific assay[J]. *J Immunol Methods*, 2017, 446: 30-36.
- [10] CHEN YQ, POTTANAT TG, CARTER QL, *et al.* Affinity capture elution bridging assay: a novel immunoassay format for detection of anti-therapeutic protein antibodies[J]. *J Immunol Methods*, 2016, 431: 45-51.
- [11] LIANG MN, KLAKAMP SL, FUNELAS C, *et al.* Detection of high- and low-affinity antibodies against a human monoclonal antibody using various technology platforms[J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2007, 5(5): 655-662.
- [12] MALONEY DG, GRILLO-LÓPEZ AJ, BODKIN DJ, *et al.* IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma[J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(10): 3266-3274.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-03-11