聚乙二醇化人粒细胞集落刺激因子抗药抗体检测方法的比较研究

徐婷婷[1,2]，王丹阳[2]，姜　宇[1,2]，周　莉[2]，邱云良[1*]

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203）

摘要：该研究使用电化学发光免疫分析（ECLIA）和表面等离子体共振技术（SPR），结合 3 种不同的样本处理方式（稀释、酸解和磁珠纯化），分别检测食蟹猴血清样本中聚乙二醇化人粒细胞集落刺激因子（PEG-G-CSF）的抗药抗体（ADA），并比较各检测方法和样品处理方式的灵敏度、药物耐受性、方法选择性等参数。结果显示，待测样品经稀释处理后，ECLIA 法的方法灵敏度为 24 ng/mL，在阳性对照抗体质量浓度为 500 ng/mL 时可耐受 4 000 ng/mL 的药物；SPR 法的方法灵敏度为 441 ng/mL，但在阳性对照抗体质量浓度为 500 ng/mL 时无法耐受 125 ng/mL 药物。与稀释处理方式相比，酸解处理并不能提高 2 种检测方法的方法灵敏度和药物耐受水平；而待测样品经磁珠纯化后，信号值显著下降，方法灵敏度较差。该研究显示，ECLIA 法结合稀释处理的组合，精密度和选择性良好、无钩状效应，适用于评价 PEG-G-CSF 的 ADA 水平。

关键词：电化学发光免疫分析；表面等离子体共振技术；免疫原性；聚乙二醇化人粒细胞集落刺激因子；抗药抗体；检测；样品前处理

中图分类号：R917；R979.1^{+}9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)04-0458-09

引用：徐婷婷, 王丹阳, 姜　宇, 等. 聚乙二醇化人粒细胞集落刺激因子抗药抗体检测方法的比较研究[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(4): 458-466. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.04.012

Comparative Study on Detection Methods of Anti-drug Antibody for PEGylated Human Granulocyte Colony-stimulating Factor

XU Tingting[1,2], WANG Danyang[2], JIANG Yu[1,2], ZHOU Li[2], QIU Yunliang[1*]

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: In this study, electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) and surface plasmon resonance (SPR) were employed, in combination with three distinct sample pretreatment approaches (dilution, acid dissociation, and magnetic bead purification), to respectively detect anti-drug antibodies (ADA) against PEGylated human granulocyte colony-stimulating factor (PEG-G-CSF) in cynomolgus monkey serum samples. The sensitivity, drug tolerance, method selectivity, and other key performance parameters of each detection method and sample pretreatment strategy were systematically compared. The results demonstrated that for the samples after dilution pretreatment, the method sensitivity of ECLIA was 24 ng/mL, and the assay could tolerate 4 000 ng/mL of the drug at a positive control antibody concentration of 500 ng/mL. In contrast, the method sensitivity of SPR was 441 ng/mL, but the assay failed to tolerate 125 ng/mL of the drug at the same positive control antibody concentration. Compared with the dilution approach, acid dissociation failed to enhance the method sensitivity and drug tolerance of either detection method. Moreover, after magnetic bead purification of the test samples, the signal values significantly declined, resulting in the poorer method sensitivity. This study indicated that the combination of ECLIA with dilution pretreatment showed excellent precision and selectivity, lacked the hook effect, and was applicable to the evaluation of ADA levels against PEG-G-CSF.

Key Words: electrochemiluminescence immunoassay; surface plasmon resonance; immunogenicity; PEGylated human granulocyte colony-stimulating factor; anti-drug antibody; detection; sample pretreatment

聚乙二醇化人粒细胞集落刺激因子（PEGylated human granulocyte colony-stimulating factor，PEG-G-CSF，**1**）通过诱导中性粒细胞增殖、分化和成熟而提高机体中性粒细胞水平，多与抗肿瘤药联合使用，治疗各种肿瘤化疗引起的中性粒细胞减少症[1]。然而，**1** 在临床应用中曾出现免疫原性介导的严重过敏反应[2-3]。

抗药抗体（anti-drug antibody，ADA）是大多数生物药免疫原性评价的主要指标之一。2019 年美国 FDA 颁布的《免疫原性评估指导原则》“Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products－Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody”和 2021 年 NMPA 颁布的《药物免疫原性研究技术指导原则》，为生物治疗药物在临床前和临床试验阶段进行免疫原性检测提供了技术指导。目前的 ADA 检测方法有 ELISA 法[4-5]、电化学发光免疫分析（electrochemiluminescence immunoassay，ECLIA）法[6]、表面等离子体共振（surface plasmon resonance，SPR）法[7]等。其中，ECLIA 法和 ELISA 法较为常用，而 SPR 检测方法无需标记，不涉及洗涤步骤，能检测到早期产生的亲和力低且解离速度快的免疫球蛋白（immunoglobulin，Ig）G 和 IgM 型 ADA。在 ADA 检测体系中，药物本身即干扰因素。当待测样品中存在药物时，其可能与 ADA 形成复合物，影响检测灵敏度，出现假阴性结果。因此，药物耐受性是检测方法开发过程中的主要关注点之一[8]。通常，采用酸解法将 ADA- 药物复合物解离，可改善药物耐受性；磁珠纯化也可富集、提取 ADA，减少血清样品中靶点和药物的干扰[9-10]。

对于 **1**，尚未见 ECLIA 法和 SPR 法的比较研究，也未见酸解法和磁珠纯化法在 ADA 检测中的应用。因此，本研究采用不同方式（稀释、酸解、磁珠纯化）处理样品，并比较 ECLIA 法和 SPR 法对食蟹猴血清样本中 **1** 的 ADA 检测结果的影响，以期为临床前或临床研究提供方法和参考依据。

1 仪器和试药

Biacore T200 型仪器（美国 Cytiva 公司）；MESO® Sector S 600 型电化学发光分析仪（美国 MSD 公司）；SMI096-SS 型多功能生物配体分离提取仪（北京新艾进生物科技有限公司）。

1 注射液（山东新时代药业有限公司，批号 02202011004，规格 1 mL∶3 mg）；抗粒细胞集落刺激因子（granulocyte colony-stimulating factor，G-CSF）抗体（英国 Abcam 公司，批号 GR279141）；食蟹猴血清（上海优宁维生物科技股份有限公司）；EZ-Link™ Sulfo-NHS 生物素化试剂盒、Blocker Casein 酪蛋白封闭液（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，批号 WK331893）；GOLD SULFO-TAG NHS-Ester Conjugation Pack 1 试剂盒（美国 MSD 公司，批号 410714）；HBS-EP$^+$ 缓冲液（含 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸、氯化钠和 EDTA，批号 33116）、S 系列传感器芯片 CM5（批号 10317560）、pH 1.5 的 10 mmol/L 甘氨酸 - 盐酸缓冲液（Gly-HCl 1.5，批号 33224）、非特异性结合减少剂（non-specific binding-reducer，NSB-reducer，批号 10321652）（美国 Cytiva 公司）；链霉亲和素 - 辣根过氧化物酶偶联物（streptavidin-horseradish peroxidase，SA-HRP，美国 R&D 公司，批号 P317101）；稀释缓冲液（北京百普赛斯生物科技有限公司，批号 20220830）；乙酸（国药集团化学试剂有限公司，批号 20220425）；三（羟甲基）氨基甲烷（Tris，美国 Sigma 公司，批号 SLCD4335）、链霉亲和素 - 磁珠（北京新艾进生物科技有限公司，粒径 0.8 μm，规格 10 mg/mL，批号 20220621）；Read buffer 4×（美国 MSD 公司，批号 Y0140390）。

2 方法和结果

2.1 溶液配制

阴性对照（negative control，NC）样品：使用 16 个不同食蟹猴的空白血清，混匀，即得。

阳性对照（positive control，PC）样品：首先将抗 G-CSF 抗体 100 μg 溶于灭菌注射用水 200 μL 中，混匀，得 PC 抗体溶液；再使用 NC 样品将 PC 抗体溶液稀释成低浓度阳性质控（low positive control，LPC）和高浓度阳性质控（high positive control，HPC）。在 ECLIA 和 SPR 检测方法中，LPC 的质量浓度分别为 160 和 1 000 ng/mL，HPC 质量浓度均为

收稿日期：2025-12-07
基金项目：上海市战略性新兴产业发展专项资金项目
作者简介：徐婷婷，博士研究生，专业方向：免疫毒理学研究。
通信作者：邱云良，研究员，从事药物毒理学、生物标志物及非临床依赖性研究。

20 μg/mL。

捕获试剂：根据 EZ-Link™ Sulfo-NHS 生物素化试剂盒说明书，按照生物素与 **1** 注射液物质的量比例为 20 ∶ 1 进行标记，制得生物素标记 **1**（以下简称“bio-**1**”），理论质量浓度为 3 mg/mL。

检测试剂：根据 GOLD SULFO-TAG NHS-Ester Conjugation Pack 1 试剂盒说明书，按照 SULFO-TAG 与 **1** 注射液物质的量比例为 10 ∶ 1 进行标记，制得钌标记 **1**（以下简称“Ru-**1**”），理论质量浓度为 1 mg/mL。

2.2 ECLIA 法

将经稀释、酸解和磁珠纯化的待测样品分别与 bio-**1**、Ru-**1** 结合。这种夹心复合物可被捕获在链霉亲和素涂层反应板上。施加电压后，钌可产生电化学发光信号值，最终读数与样品中 ADA 含量呈正相关。

2.2.1 稀释处理方式

将 **1** 注射液用 0.05%的 Blocker Casein 酪蛋白封闭液稀释 5 倍，稀释液待用。将 bio-**1** 和 Ru-**1** 分别用 0.05%的 Blocker Casein 酪蛋白封闭液进行 4 000 倍稀释，再将 2 种检测试剂按体积比 1 ∶ 1 混合，得检测试剂混合溶液（确证试验使用含 100 μg/mL **1** 的检测试剂混合溶液）；将其与上述稀释液按体积比 1 ∶ 1 混合（75 μL+75 μL），室温下 600 r/min 振荡孵育 2 h，然后以每孔 50 μL 转移至使用 Blocker Casein 酪蛋白封闭液封闭后的链霉亲和素 MSD 板中，室温、600 r/min 振荡孵育 1 h，最后加入读板缓冲液（Read buffer 2×），使用电化学发光仪进行读板。

2.2.2 酸解处理方式

将 **1** 注射液用 300 mmol/L 乙酸溶液稀释 5 倍，室温酸解 20 min，然后将酸解产物与“**2.2.1**”项下的检测试剂混合溶液（确证试验使用含 100 μg/mL **1** 的检测试剂混合溶液）按体积比 1 ∶ 1 混合（60 μL+60 μL），再与 1 mol/L Tris 溶液 40 μL 进行中和，室温、600 r/min 振荡孵育 2 h，然后按“**2.2.1**”项下方法操作，进行读数。

2.2.3 磁珠纯化方式

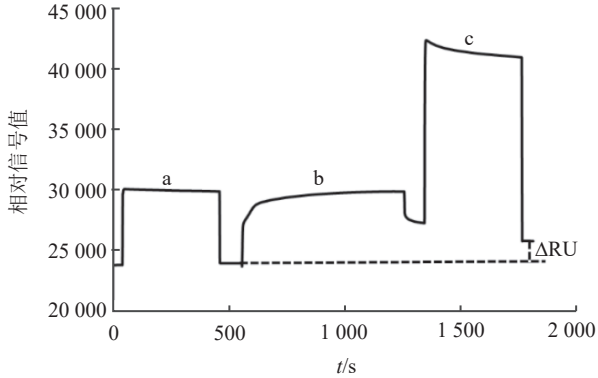
吸取 10 mg/mL 链霉亲和素 - 磁珠 500 μL 和 bio-**1** 70 μL，轻柔混匀 1 h，然后静置 2 min，使磁珠吸附于离心管侧壁，弃去液体；加入稀释缓冲液 1 mL 洗涤磁珠，重复洗涤 4 次；最后，向剩余物中加入与磁珠原体积等量的稀释缓冲液进行回收，即得 bio-**1**- 链霉亲和素 - 磁珠偶联物。

将 **1** 注射液用稀释缓冲液稀释 5 倍后，加入上述所得的 bio-**1**- 链霉亲和素 - 磁珠偶联物 50 μL，以提取样品中的 ADA，通过多功能生物配体分离提取仪吸附磁珠复合物，弃去液体，剩余物用稀释缓冲液 300 μL 洗涤 1 次，再用 300 mmol/L 乙酸溶液酸解 20 min，酸解产物照“**2.2.2**”项下方法操作，进行读数。

2.3 SPR 法

将 **1** 通过氨基偶联在 CM5 传感芯片上。设置偶联参数为：pH 值为 4.5，药物质量浓度为 300 μg/mL，流速为 10 μL/min，进行手动氨基偶联。偶联过程的共振单位变化如图 1 所示。首先，将 NHS 和 1-乙基 -3-（3- 二甲胺基丙基）碳二亚胺［1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide，EDC］按体积比 1 ∶ 1 混合，活化 CM5 芯片表面的羧甲基基团；然后，将 **1** 的氨基与 NHS 进行共价偶联；最后，使用乙醇胺溶液将未反应的 NHS 失活。使用乙醇胺封闭后，偶联物的相对信号差值（ΔRU）约为 1 855.7。

分别将上述经稀释、酸解和磁珠纯化的待测样



a 段—NHS 和 EDC 活化芯片表面；b 段—**1** 结合在芯片表面；c 段—乙醇胺封闭芯片表面残余的活化羧基。

图 1　1 在 CM5 芯片表面偶联过程中的共振单位变化

Fig.1　The Resonance Unit Changes during the Coupling Process of **1** on the CM5 Chip Surface

品注入芯片通道，ADA 与芯片表面偶联的配体发生结合反应，可引起芯片折射率变化。实时监测并记录相对信号值随时间的变化趋势，结果显示相对信号值与芯片表面结合的 PC 抗体成正比。活化并封闭空白通道作为参比通道，每隔 18 ～ 22 个待测样品后运行一套质控样品，使用 Gly-HCl 1.5 进行再生（4 次循环再生后检测通道的基线值为 25 042，接近检测前的基线水平 25 005），即可重复测样。

2.3.1 稀释处理方式

将 **1** 注射液用含 10% NSB-reducer 的 HBS-EP$^+$（1×）溶液（确证试验使用含 100 μg/mL **1** 的稀释缓冲液）稀释 5 倍，进样检测。

2.3.2 酸解方式

将 **1** 注射液用 300 mmol/L 乙酸溶液（确证试验使用含 100 μg/mL **1** 的乙酸溶液）稀释 5 倍，室温酸解 20 min，然后与 1 mol/L Tris 溶液按体积比 3 ∶ 1（180 μL+60 μL）进行中和，并加入 NSB-reducer 24 μL（约占总体积的 10%），混匀后进样检测。

2.3.3 磁珠纯化方式

将 **1** 注射液用稀释缓冲液稀释 5 倍，加入 bio-**1**- 链霉亲和素 - 磁珠偶联物 50 μL，以提取样品中的 ADA；通过多功能生物配体分离提取仪吸附磁珠复合物，弃去液体，剩余物用稀释缓冲液 300 μL 洗涤 1 次，再用 300 mmol/L 乙酸溶液酸解 20 min，然后按“**2.3.2**”项下方法操作后进样检测。

2.4 最小稀释倍数

将不同处理方式（稀释、酸解、磁珠纯化）中所有步骤的累积稀释度（即各步骤稀释倍数的乘积）作为该方法的最小稀释倍数（minimum required dilution，MRD），表示为 X。结果（表 1）显示，与 ECLIA 法不同处理方式的稀释倍数相比，SPR 法的稀释倍数相对较小。

2.5 筛选临界值（screen cut point，SCP）和确证临界值（confirmatory cut point，CCP）的确定

通过对食蟹猴阴性血清样本的重复测定确定 SCP 和 CCP。《药物免疫原性研究技术指导原则》规定，SCP 用于初步判定待测样本是否为阴性或潜在阳性（或称疑似阳性），CCP（以抑制率表示）用于进一步确定是否为阳性。样品信号值大于等于 SCP 时判断为潜在阳性，样品抑制率大于等于 CCP 则可被判定为阳性。

表 1 不同处理方式的最小稀释倍数

Tab.1 Minimum Required Dilution for Different Treatments

操作步骤	ECLIA 法			SPR 法		
	稀释	酸解	磁珠纯化	稀释	酸解	磁珠纯化
稀释缓冲液稀释	1/5	—	1/5	1/5	—	1/5
酸解	—	1/5	—	—	1/5	—
Tris 中和 / 与检测试剂孵育	1/2	3/8	3/8	—	3/4	3/4
1/X	1/10	1/13	1/13	1/5	1/7	1/7
MRD	10	13	13	5	7	7

SCP 的计算（筛选试验）：基于 16 个食蟹猴个体（雌雄各半）空白血清，在 3 d 内进行 3 次独立分析，获得所有批次个体样品和 NC 样品的信噪比（signal to noise ratio，*S*/*N*）数据。首先利用 SPSS Statistics 21 软件绘制 Box-plots 图，对 *S*/*N* 值进行离群值分析；再使用 Shapiro-Wilk 检验分析数据分布。数据分布若满足 P>0.05 或偏度位于［－1，1］，可使用参数模型计算；此时，基于信号均值的单侧 95% 置信区间（5% 假阳性率），按式①计算乘法校正因子（multiplicative correction factor，MCF），按式②计算浮动筛选临界值（$SCP_{floating}$）。本文中，SCP1、SCP2、SCP3 和 SCP4 分别对应 ECLIA- 稀释处理、ECLIA- 酸解处理、SPR- 稀释处理和 SPR- 酸解处理的筛选临界值。

CCP 的计算（确证试验）：与筛选试验平行运行相同的食蟹猴个体空白血清，加入 100 μg/mL **1** 进行竞争抑制试验，在 3 d 内进行 3 次独立分析。采用与筛选试验相同的数据处理方式，计算抑制率（*I*）（式③）。采用抑制率的单侧 99% 置信区间设定 CCP（式④）。

$$MCF=Mean_{(S/N)}+1.64\times SD_{(S/N)} \quad ①$$

$$SCP_{floating}=MCF\times NC_{均值} \quad ②$$

I=（1－加入药物处理的样品信号值 / 未加入药物处理的样品信号值）×100% ③

$$CCP = Mean_{(Inhibition)} + 2.33 \times SD_{(Inhibition)} \quad ④$$

式中：$Mean_{(S/N)}$ 表示个体空白血清的 *S/N* 均值；$SD_{(S/N)}$ 表示个体空白血清 *S/N* 值的标准差；$NC_{均值}$表示分析批中 NC 的均值；$Mean_{(inhibition)}$ 表示个体空白血清的抑制率均值；$SD_{(inhibition)}$ 表示个体空白血清抑制率的标准差。

2.5.1 ECLIA 法

经稀释处理后，分别有 46 个和 48 个样品参与 MCF 和 CCP 计算，所得 MCF 为 1.10，CCP 为 25.5%；经酸解处理后，各有 48 个样品参与 SCP 和 CCP 计算，所得 MCF 为 1.29，CCP 为 29.8%。结果如图 2 所示。

经磁珠纯化后，PC 样本信号值显著下降（具体结果见“**2.6**”项），故不再计算 SCP 和 CCP。

2.5.2 SPR 法

经稀释处理后，分别有 48 个和 44 个样品参与 MCF 和 CCP 计算，所得 MCF 为 1.35，CCP 为 27.5%；经酸解处理后，各有 48 个样品参与 SCP 和 CCP 计算，所得 MCF 为 1.31，CCP 为 29.5%。结果如图 2 所示。

经磁珠纯化后，PC 样本信号值也显著下降（具体结果见“**2.6**”项），故不再计算 SCP 和 CCP。

2.6 方法灵敏度

使用食蟹猴混合空白血清将 PC 抗体梯度稀释至质量浓度分别为 10 000、5 000、2 500、1 250、625、312、156 和 78 ng/mL，作为阳性滴度曲线样品。在 PC 抗体滴度曲线中，采用高于及低于 $SCP_{floating}$ 的 2 个浓度点以截距法计算方法灵敏度。

2.6.1 ECLIA 法

经稀释处理后，阳性滴度曲线样品的信号均值范围为 119 ～ 3 336，*S/N* 值范围为 1.37 ～ 38.62，方法灵敏度为 24 ng/mL；经酸解处理后，阳性滴度曲线样品信号均值为 103 ～ 2 485，*S/N* 值范围为 1.29 ～ 31.25，方法灵敏度为 77 ng/mL（图 3）。待测样品经磁珠纯化处理后，仅考察了 20 000 和 156 ng/mL 的 PC 抗体，其信号均值分别为 562 和 64，*S/N* 值分别为 9.22 和 1.05。

与稀释处理和酸解处理相比，样品经磁珠纯化处理后信号值显著下降，故后续不再计算方法灵敏度，也不再考察其他指标。

2.6.2 SPR 法

经稀释处理后，阳性滴度曲线样品信号值为 39 ～ 393，*S/N* 值范围为 1.02 ～ 10.2，方法灵敏度为

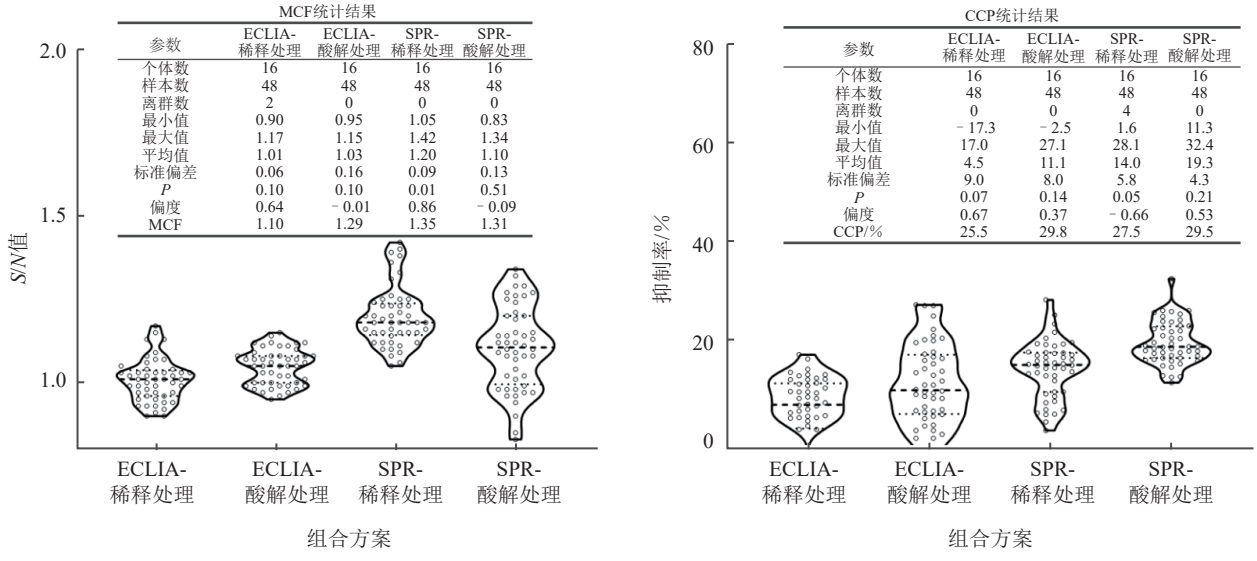
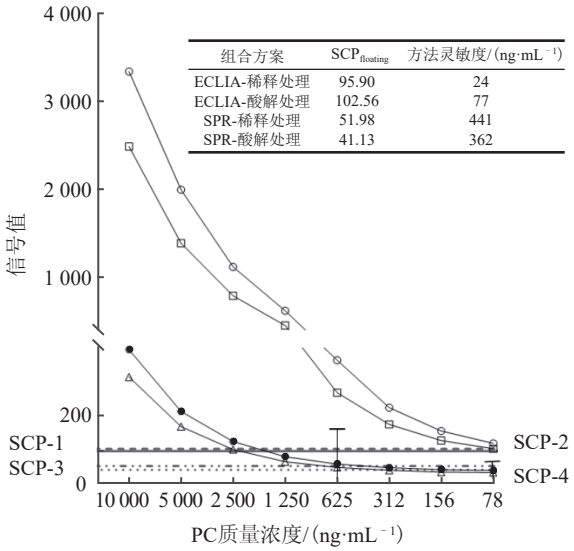


图 2　筛选试验（A）和确证试验（B）结果

Fig.2　Results of Screening Assay (A) and Confirmatory Assay (B)

441 ng/mL；经酸解处理后，阳性滴度曲线样品信号值为 33 ～ 313，*S/N* 值范围为 1.05 ～ 9.98，方法灵敏度为 362 ng/mL（图 3）。待测样品经磁珠纯化处理后，阳性滴度曲线样品信号值范围为 －1.2 ～ 8.9。

与稀释处理和酸解处理相比，样品经磁珠纯化处理后信号值显著下降，故后续不再计算方法灵敏度，也不再考察其他指标。



组合方案	$SCP_{floating}$	方法灵敏度/(ng·mL⁻¹)
ECLIA-稀释处理	95.90	24
ECLIA-酸解处理	102.56	77
SPR-稀释处理	51.98	441
SPR-酸解处理	41.13	362

○—ECLIA- 稀释处理；□—ECLIA- 酸解处理；
●—SPR- 稀释处理；△—SPR- 酸解处理。

图 3　方法灵敏度结果

Fig.3　Results of Assay Sensitivity

2.7　药物耐受性

使用食蟹猴混合空白血清稀释 **1** 至质量浓度分别为 8 000、4 000、2 000、1 000、500、250 和 125 ng/mL，同时使用食蟹猴混合空白血清稀释 PC 抗体至 2 000 和 1 000 ng/mL，然后将系列稀释的药物分别与不同质量浓度的 PC 抗体样品按体积比 1 ∶ 1 混匀，作为药物耐受曲线样品。将 PC 抗体信号值不小于 $SCP_{floating}$ 对应的质量浓度作为药物耐受质量浓度。

2.7.1　ECLIA 法

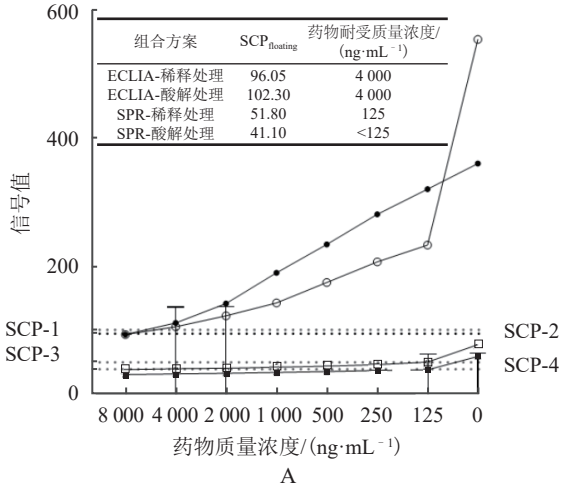
待测样品经稀释处理后，在 PC 抗体质量浓度为 1 000 和 500 ng/mL 时的药物耐受质量浓度均为 4 000 ng/mL；待测样品经酸解后，同样情况下的药物耐受质量浓度分别为 4 000 和 2 000 ng/mL（图 4）。

2.7.2　SPR 法

待测样品经稀释处理后，在 PC 抗体质量浓度为 1 000 ng/mL 时的药物耐受质量浓度为 125 ng/mL，在 500 ng/mL 时药物耐受质量浓度低于 125 ng/mL；待测样品经酸解处理后，在 PC 抗体质量浓度为 1 000 和 500 ng/mL 时均无法耐受 125 ng/mL 的 **1**（图 4）。

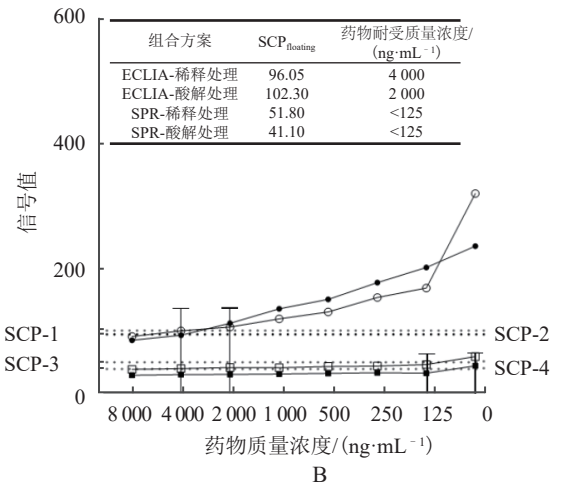
2.8　钩状效应

使用食蟹猴混合空白血清将 PC 抗体梯度稀释至质量浓度分别为 100 000、20 000、4 000 和 800 ng/mL，



组合方案	$SCP_{floating}$	药物耐受质量浓度/(ng·mL⁻¹)
ECLIA-稀释处理	96.05	4 000
ECLIA-酸解处理	102.30	4 000
SPR-稀释处理	51.80	125
SPR-酸解处理	41.10	<125

A



组合方案	$SCP_{floating}$	药物耐受质量浓度/(ng·mL⁻¹)
ECLIA-稀释处理	96.05	4 000
ECLIA-酸解处理	102.30	2 000
SPR-稀释处理	51.80	<125
SPR-酸解处理	41.10	<125

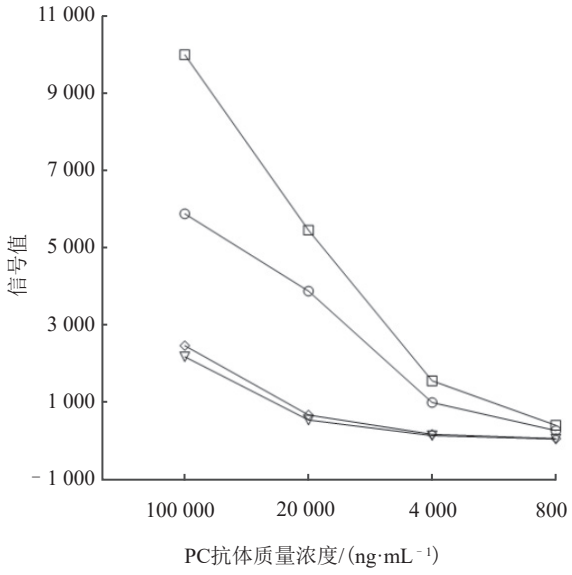
B

○—ECLIA- 稀释处理；●—ECLIA- 酸解处理；□—SPR- 稀释处理；■—SPR- 酸解处理。

图 4　PC 抗体质量浓度为 1 000 ng/mL（A）和 500 ng/mL（B）时的药物耐受性结果

Fig.4　Drug Tolerance Results at PC Antibody Concentrations of 1 000 ng/mL (A) and 500 ng/mL (B)

配制钩状曲线样品。结果显示，采用 ECLIA 法和 SPR 法，且待测样品采用稀释处理或酸解处理，在 PC 抗体为 800 ～ 100 000 ng/mL 时，样品信号值均随 PC 抗体质量浓度的增加而增加（图 5），未出现钩状效应。



□—ECLIA- 稀释处理；○—ECLIA- 酸解处理；
◇—SPR- 稀释处理；▽—SPR- 酸解处理。

图 5　钩状效应结果

Fig.5　Results of Hook Effect

2.9　方法选择性

选择性是指该方法能够在样本中存在其他成分的情况下，特异性检测出 ADA 的能力。分别用 10 个食蟹猴个体的空白血清配制 LPC，作为方法选择性样品。需要至少 80%个体空白血清配制的 LPC 样品经筛选、确证试验，结果均为 ADA 阳性；至少 80%阴性个体空白血清经筛选、确证试验，结果判断为 ADA 阴性（若筛选结果为阳性，需计算 I 且 I 值应小于 CCP）。

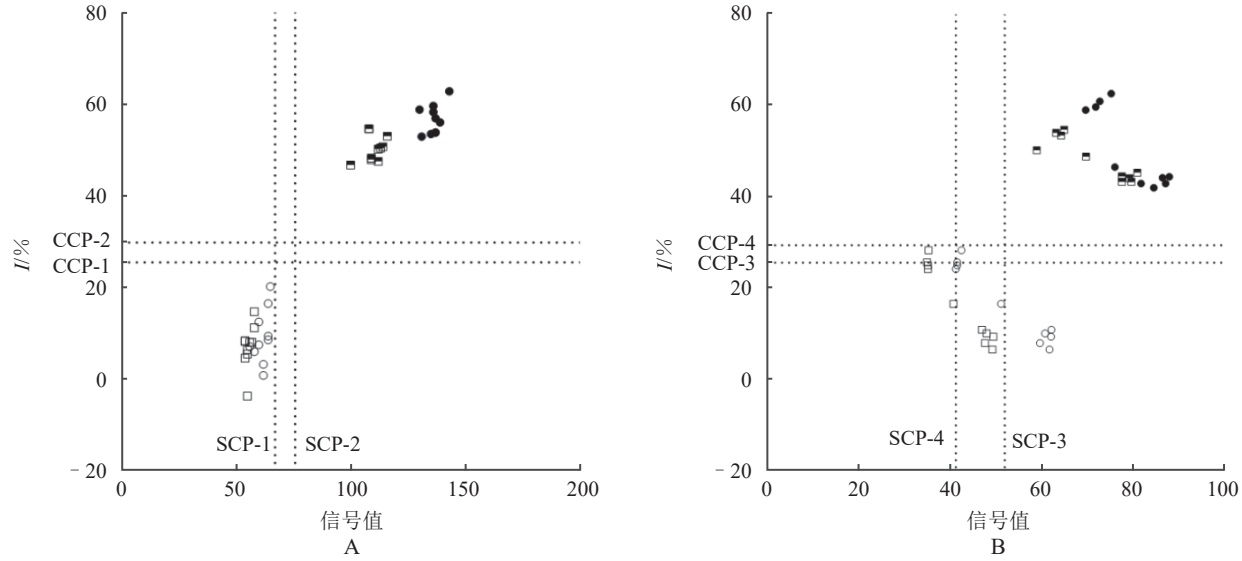
结果（图 6）显示，采用 ECLIA 法和 SPR 法，待测样品经稀释或酸解处理后，10 个食蟹猴个体空白血清配制的 LPC 样品均为 ADA 阳性，10 个食蟹猴个体空白血清样品为 ADA 阴性。

2.10　批内、批间精密度试验

使用 5 个分析批中的 NC、LPC 和 HPC 样品的信号值，评估批内、批间精密度。精密度以变异系数（coefficient of variation，CV）表示，且各分析批中 LPC 和 HPC 样品的信号均值均需高于 $SCP_{floating}$。

2.10.1　ECLIA 法

经稀释处理后，NC、LPC 和 HPC 样品的批



○—个体（稀释处理）；●—LPC+ 个体（稀释处理）；□—个体（酸解处理）；■—LPC+ 个体（酸解处理）。

图 6　ECLIA 检测（A）和 SPR 检测（B）的方法选择性结果

Fig.6　Results of Selectivity in ECLIA and SPR Assays

内 CV 为 0.7 % ～ 13.1 %，批间 CV 为 13.6 % ～ 17.6%；经酸解处理后，NC、LPC 和 HPC 样品的批内 CV 为 0.7%～ 11.3%，批间 CV 为 9.1%～ 17.7%（表 2）。可见，质控样品的批间和批内 CV 均在 20%以内，且 LPC 和 HPC 样品的信号均值均高于 $SCP_{floating}$，表明该方法具有较好的精密度。

2.10.2 SPR 法

经稀释处理后，NC、LPC 和 HPC 样品的批内 CV 为 0.7%～ 2.3%，批间 CV 为 2.2%～ 3.8%；经酸解处理后，NC、LPC 和 HPC 样品的批内 CV 为 0.6%～ 3.1%，批间 CV 为 2.1%～ 4.4%（表 2）。可见，质控样品的批间和批内 CV 均在 20%以内，且 LPC 和 HPC 样品的信号均值均高于 $SCP_{floating}$，表明该方法具有较好的精密度。

表 2 精密度试验结果

Tab.2 Results of Precision Test

检测方法	样品处理方式	质控样品	批内 CV/%	批间 CV/%
ECLIA 法	稀释处理	NC	0.7 ～ 11.6	17.6
		LPC	0.8 ～ 13.1	13.6
		HPC	1.2 ～ 11.0	15.8
	酸解处理	NC	5.7 ～ 11.3	15.5
		LPC	0.7 ～ 9.7	17.7
		HPC	2.1 ～ 4.1	9.1
SPR 法	稀释处理	NC	1.2 ～ 2.3	2.7
		LPC	1.0 ～ 1.2	2.2
		HPC	0.7 ～ 1.0	3.8
	酸解处理	NC	2.0 ～ 2.9	4.4
		LPC	0.6 ～ 3.1	2.1
		HPC	0.6 ～ 1.2	3.3

3 讨论

评价生物药物的免疫原性时，ADA 的检测结果受方法检测性能和抗体特性差异等影响，其中方法灵敏度和药物耐受性是 ADA 检测方法开发和技术评估研究的关键参数 [11-12]。本试验在开发初期，使用了 ELISA 法、ECLIA 法和 SPR 法 3 种检测方法对抗 **1** 抗体进行评价，因桥联 ELISA 法的方法灵敏度较差，约在 1 000 ng/mL 以上，故没有继续使用（本文中未呈现 ELISA 法结果）。结果显示，ECLIA 法的方法灵敏度在 100 ng/mL 以内；SPR 法的方法灵敏度在 500 ng/mL 以内，符合 NMPA 指导原则中规定的生物药物临床前方法灵敏度的研究要求。

据文献 [13-15] 报道，已上市的 **1** 产品 Neulasta、Lonquex 及仿制药物 PF-06881894、INTP5 在临床试验中使用 ECLIA 法评估免疫原性，方法灵敏度均在 100 ng/mL 以内。此外，Fulphila、Udenyca、Grasustek 等 **1** 产品在说明书中提到使用 SPR 法评价免疫原性，方法灵敏度为 500 ng/mL。蔡永明等 [16] 使用间接 ELISA 法测定 PEG30-rhG-CSF 在大鼠和 Beagle 犬体内产生的 ADA，没有提到方法灵敏度结果。目前尚未见有文献使用桥联 ELISA 法对 **1** 中的 ADA 进行检测，原因可能是 **1** 的相对分子质量较小，不具备抗体类药物的二价结构，采用桥联 ELISA 法检测 ADA 时无法获得高 *S*/*N* 值。

药物耐受性是 ADA 检测方法开发和验证的重点考察项之一。文献 [10-11] 报道通过酸解方式解离 ADA-药物复合物，可将药物耐受水平提升 5～40 倍；磁珠纯化 [10] 也常用于克服药物干扰问题。本研究中，待测样品经稀释和酸解分别处理后，ECLIA 法检测结果显示 PC 抗体质量浓度为 500 ng/mL 时的药物耐受分别是 4 000 和 2 000 ng/mL；SPR 法检测结果显示 PC 抗体质量浓度为 500 ng/mL 时的药物耐受低于 125 ng/mL。上述结果提示，酸解处理没有提高药物耐受性；ECLIA 法的药物耐受性显著高于 SPR 法。而使用磁珠纯化处理后，PC 样品信号值降低；更换链霉亲和素 - 磁珠、生物素、磁珠处理液、处理时间、酸解时间，以及增加磁珠和生物素药物的偶联量均无法解决此问题（限于篇幅，文中未列出数据）。据文献 [9] 报道，PEG 化药物 BMS-931699（lulizumab）在中和抗体测定时，使用磁珠处理也出现抗药中和抗体结果较差的现象。基于此，推测是由于 **1** 的相对分子质量较小，使用磁珠纯化时，药物的 PEG 部分可能通过空间位阻影响 ADA 和生物素化 **1** 的相互作用，最终导致 ADA 的回收率低。

本研究使用 ECLIA 法和 SPR 法，结合 3 种不同的样品处理方式对 **1** 的 ADA 进行检测，并比较了各法的检测效果。结果显示，在待测样品经稀释或酸解处理的情况下，ECLIA 法具有较好的方法灵敏

度和药物耐受水平，且结合稀释处理的效果更佳；而 SPR 法的方法灵敏度和药物耐受水平相对较差，但因不需要标记药物、自动化程序高等，可作为备选方法。本研究可为 **1** 的临床前或临床研究中 ADA 的检测提供依据和参考。

参考文献：

[1] KIANG J G, ZHAI M, LIN B, *et al*. Co-therapy of PEGylated G-CSF and ghrelin for enhancing survival after exposure to lethal radiation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, **12**: 628018.

[2] CHEN C, QI J, WANG J. Anaphylaxis caused by PEGylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor [J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2023, **29**(3): 727-730.

[3] OKADA N, TARO S, ANDO H, *et al*. Clinical impact of antipolyethylene glycol (PEG) antibody in hematological patients administered PEGylated-granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2023, **12**(8): 826-831.

[4] PROFAIZER T, ELGORT M G, DELGADO J C. Development and laboratory validation of an electrochemiluminescence ELISA technique for measuring infliximab concentrations and anti-drug antibodies [J]. *J Immunol Methods*, 2025, **540**: 113865.

[5] 霍一凡, 徐嘉辰, 黄美晴, 等. 恒河猴血清中预存抗AAV8衣壳总抗体检测方法的建立与确认[J]. 中国医药工业杂志, 2024, **55**(6): 851-859.

[6] WYANT T, YANG L, ROSARIO M. Comparison of the ELISA and ECL assay for vedolizumab anti-drug antibodies: assessing the impact on pharmacokinetics and safety outcomes of the Phase 3 GEMINI Trials [J]. *AAPS J*, 2020, **23**(1): 3.

[7] Di SANTO A, ACCINNO M, ERRANTE F, *et al*. Quantitative evaluation of adalimumab and anti-adalimumab antibodies in sera using a surface plasmon resonance biosensor [J]. *Clin Biochem*, 2024, **133-134**: 110838.

[8] ZANGHI J, YU N, ANDREWS B T, *et al*. Revisiting the anti-drug antibody assay drug tolerance of a commercial biological product [J]. *AAPS J*, 2025, **28**(1): 41.

[9] XU W, SANK M, CUMMINGS J, *et al*. Bead-extraction and heat-dissociation (BEHD): a novel way to overcome drug and matrix interference in immunogenicity testing [J]. *J Immunol Methods*, 2018, **462**: 34-41.

[10] DU J, YANG Y, ZHU L, *et al*. Method validation of a bridging immunoassay in combination with acid-dissociation and bead treatment for detection of anti-drug antibody [J]. *Heliyon*, 2023, **9**(3): e13999.

[11] YE S, GAMBARDELLA J, ZASLAVSKAIA L, *et al*. Overcoming target interference in bridging anti-drug antibody (ADA) assay by optimizing sample treatment [J]. *Bioanalysis*, 2025, **17**(15): 941-950.

[12] PLATCHEK M, LU Q, TRAN H, *et al*. Comparative analysis of multiple immunoassays for cytokine profiling in drug discovery [J]. *SLAS Discov*, 2020, **25**(10): 1197-1213.

[13] ZOU L, NOCK S. Immunogenicity assessment of PEGylated proteins, Lonquex, a PEGylated G-CSF case study [M]// PASUT G, ZALIPSKY S. Polymer-protein conjugates from PEGylation and beyond. S.l.: Elsevier, 2020: 125-140.

[14] MOOSAVI S, BOREMA T, EWESUEDO R, *et al*. PF-06881894, a proposed biosimilar to pegfilgrastim, versus US-licensed and EU-approved pegfilgrastim reference products (Neulasta®): pharmacodynamics, pharmacokinetics, immunogenicity, and safety of single or multiple subcutaneous doses in healthy volunteers [J]. *Adv Ther*, 2020, **37**(7): 3370-3391.

[15] HAJELA P, PATEL R, KALE P, *et al*. A comparative multi-tiered immunogenicity assessment of biosimilar pegylated filgrastim: validation of methods for clinical assessment of INTP5 [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2022, **22**(2): 321-330.

[16] 蔡永明, 姜　凌, 李　铭, 等. 聚乙二醇化重组人粒细胞集落刺激因子大鼠和Beagle犬的免疫原性[J]. 药物评价研究, 2010, **33**(4): 272-274.