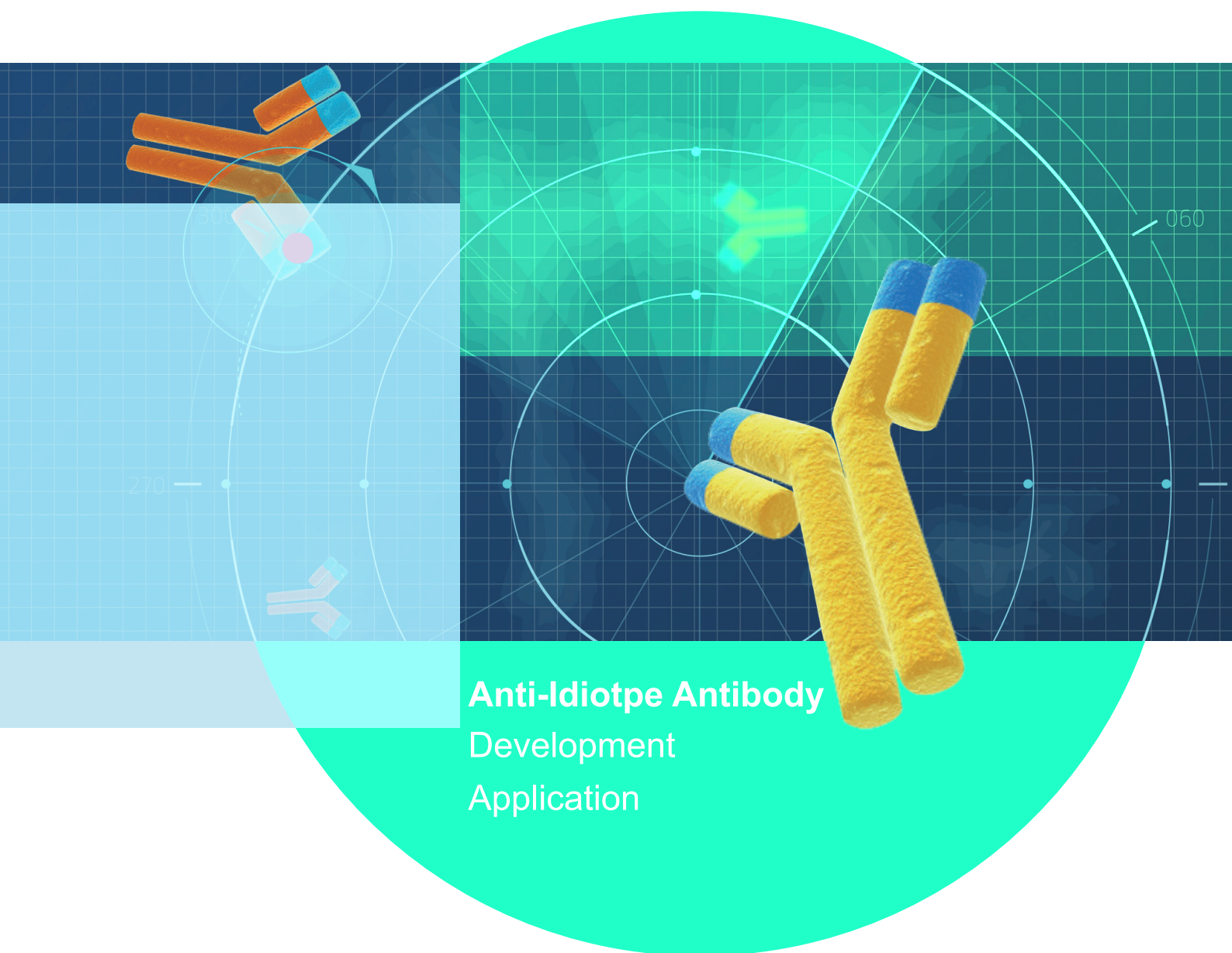
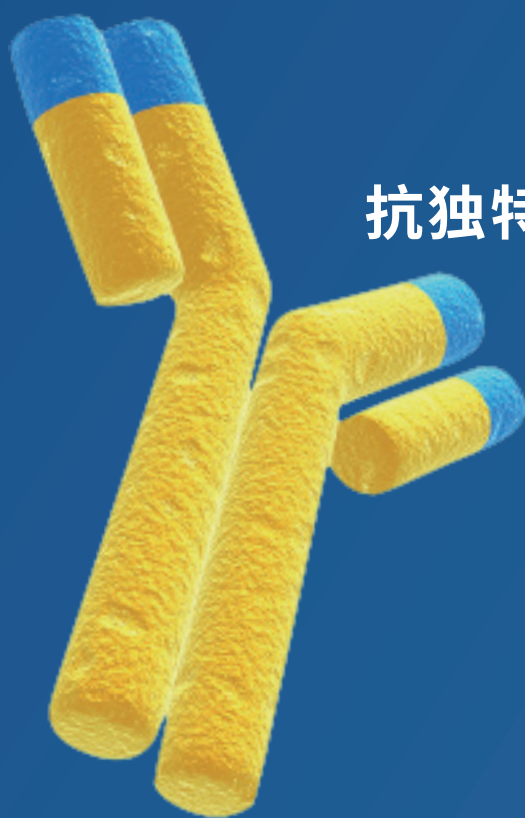


抗独特型抗体开发 实用手册



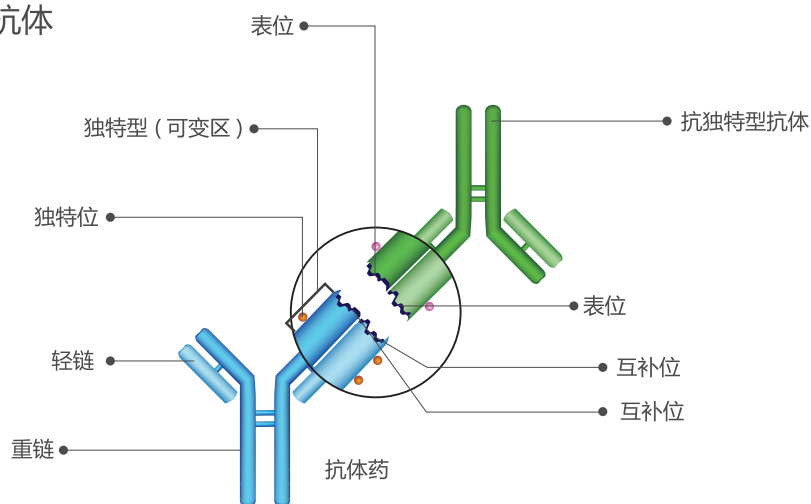
Anti-Idiotpe Antibody
Development
Application



抗独特型抗体开发 实用手册

背景介绍

A 什么是抗独特型抗体



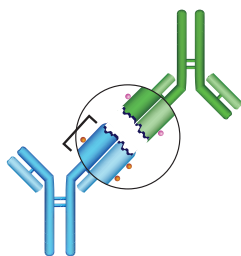
抗独特型抗体示意图

抗独特型抗体(Anti-idiotypic antibody)能够特异性识别待测抗体位于可变区的独特位,其可以区分血清等样品中天然产生的内源性抗体,是药代动力学 (pharmacokinetics) 研究中用于抗体水平检测的重要试剂。

此外,药物进入人体后,会产生抗药物抗体。由于抗独特型抗体与抗药物抗体间的相似性,其可以作为免疫原性研究的重要参照,具有抗原阻断能力的抗独特型抗体又可以作为中和型抗体检测的重要试剂。

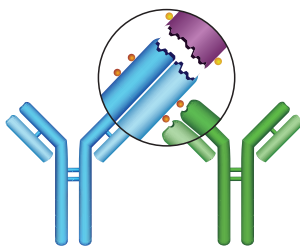
B 抗独特型单抗的类型

抗原阻断型



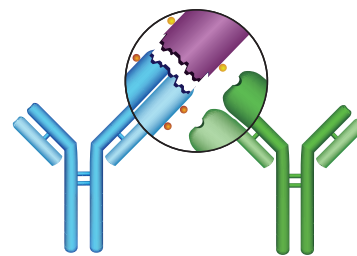
- 互补位特异
- 阻断抗原抗体结合
- 检测游离型抗体药
- 检测中和抗体

抗原非阻断型



- 互补位非特异
- 不阻断抗原抗体结合
- 检测抗体药总量
(游离, 半结合, 结合)

药物靶标复合物型



- 特异结合药物靶标复合物
- 不阻断抗原抗体结合
- 特异性检测结合型抗体药

由于第三类抗独特型抗体开发难度大,实际应用中通常选择开发前两种抗体,通过计算获得结合型抗体药含量。

C 抗独特型抗体在生物药开发过程中的应用

抗独特型抗体可特异性识别生物药的独特位，在药代动力学研究中作为不可或缺的检测试剂用于动物及人血清中抗体药的含量测定。由于抗独特型单抗均一性好，特异性强，在临床前药学研究及临床阶段推荐使用独特型单抗进行测定。在药物发现阶段，可开发独特型多抗，甚至用抗原捕获的方式对药物含量进行初步的检测。如果检测灵敏度需在纳克级别，可开发鼠源抗独特型单抗用于检测，若希望灵敏度达到皮克级别可考虑开发兔源抗独特型单抗。

由于抗独特型抗体跟抗药物抗体间的相似性，其在免疫原性分析中还可作为抗药物抗体的阳性对照用于抗药物抗体总量的测定。由于独特型多抗的覆盖率高，可最大限度的模拟抗药物抗体的情况，通常推荐使用抗独特型多抗作为抗药物抗体检测的阳性对照。对于抗药物抗体中的中和型抗药物抗体的检测，则需开发在抗原竞争条件下依旧可以阻断药物与药物靶标结合的抗独特型单抗作为检测参照。

药代动力学研究及免疫原性分析贯穿到整个药物生命周期中，抗独特型抗体作为必备工具试剂，其不但是临床申报必不可少的试剂之一，在临床阶段也有十分广泛的应用。

D 抗独特型抗体的开发时机

根据 NMPA 规定，需使用中试生产的样品进行药代动力学及免疫原性分析。由于用于药代动力学分析的抗独特型单抗的开发周期在半年左右，用于免疫原性分析的抗独特型多抗的开发周期在 2-3 个月左右，酶联免疫分析方法学建立需耗时 2 个月左右，因此建议最迟在稳定细胞系构建阶段，即刚开始进入到临床前药学研究时就进行抗独特型抗体的开发，避免因关键试剂开发延误导致药物临床申报不能按期完成。



E 抗独特型抗体在 IND 申报和临床使用中的合规性指导

对于配体结合分析 (ligand binding assay, LBA)，方法的关键试剂，如结合蛋白、适配子、抗体或偶联抗体、酶等，对分析结果会产生直接影响，因此须确保质量。如果在方法验证或样品分析过程中，关键试剂批次发生改变，须确认方法性能不因此改变，从而确保不同批次结果的一致性。

在 IND 申报和临床试验中，药代动力学和免疫原性检测是重要的药效和安全性检测方法。而抗独特型抗体是药代动力学和免疫原性检测试剂盒的主要原料。因此作为关键试剂，抗独特型抗体的质量会对后续药代动力学 / 免疫原性检测的效果和准确性产生重大影响。尤其在长期的临床试验使用中，确保试剂盒批次间的一致性至关重要。因此需要一个严格的关键试剂管理策略，以确保检测试剂盒的批次间一致性，从而保证检测结果的可靠性。

合规性的指导原则参见《药品记录与数据管理要求（试行）》

• 数据管理：

完善的操作规程和管理制度规范生产过程中产生数据的记录和复核要求；

产生数据的计量器具定期进行校验和检定，保证数据可靠性；

原始数据按照数据管理要求进行备份。

• 记录管理：

完整的纸质操作规程文件与实验记录表单；

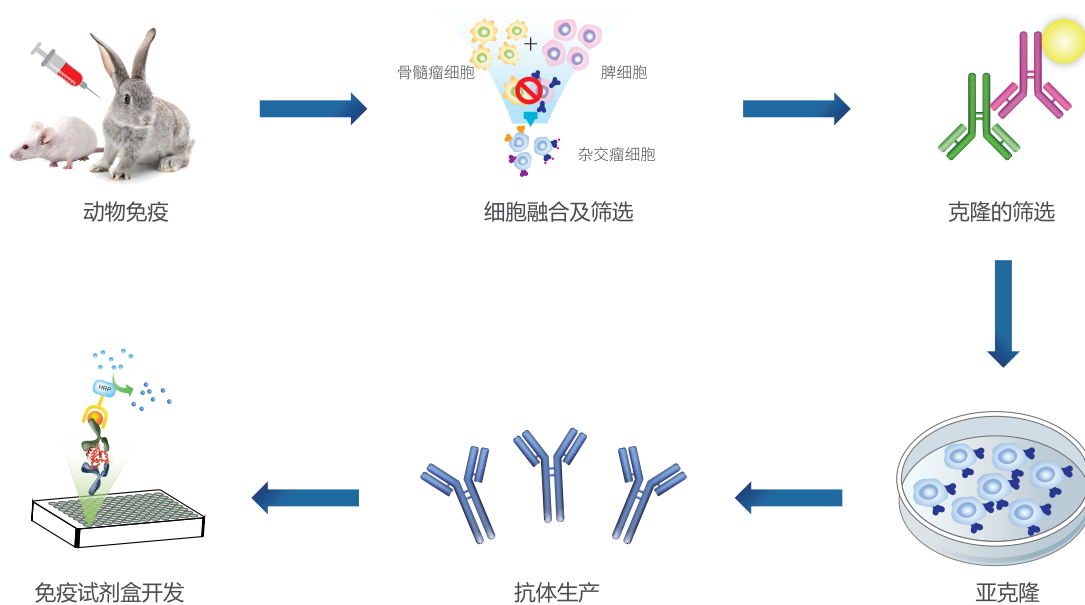
完善的文件记录质量管理体系，包括文件、记录的批准与审核、印制与发放、记录要求、归档保存、复印与销毁等流程；

完善的电子化记录管理体系，包括计算机化系统的定期检验、时间与时区管理、系统数据的备份、操作权限与用户权限管理等。

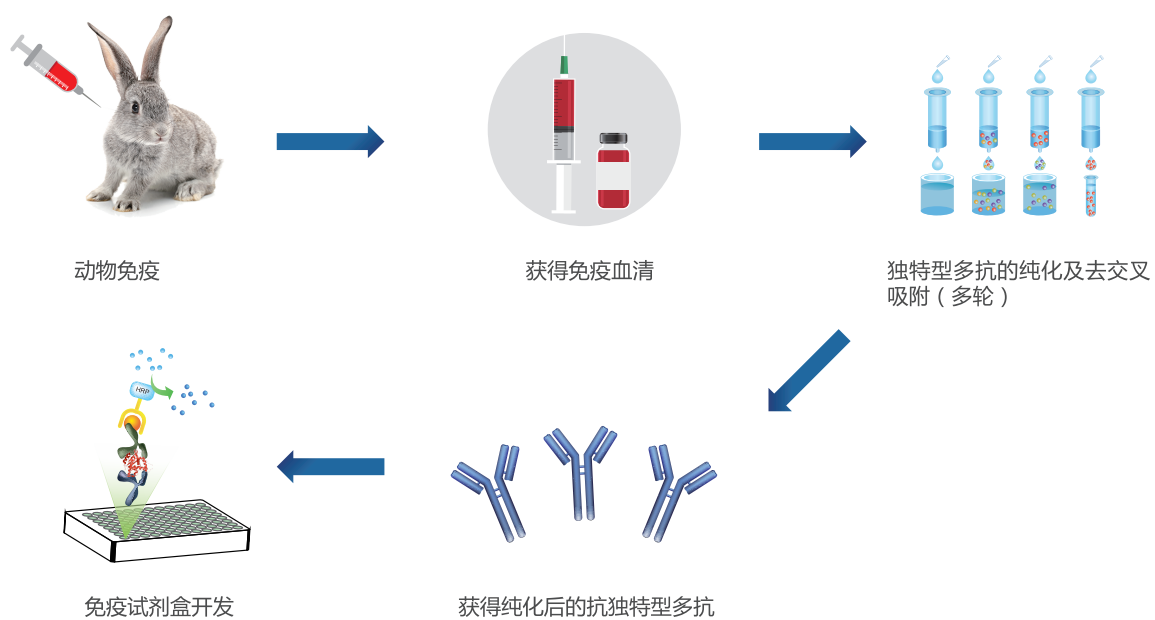


开发流程

A 独特型单抗的开发流程



B 独特型多抗的开发流程



开发策略

A 不同类型抗体药的抗独特型抗体开发策略对比

	独特型单抗	独特型多抗
传统单抗	针对抗体可变区开发一个或一对抗独特型抗体	针对抗体可变区开发一个多抗
单域抗体 / 单链抗体	针对全长抗体（可变区）开发一个或一对抗独特型抗体	针对全长抗体（可变区）开发一个多抗
ADC	- 针对小分子开发一个抗独特型抗体 - 针对抗体可变区开发一个抗独特型抗体	针对整个 ADC 分子开发一个多抗
双特异性抗体	针对两个特异性元件的可变区各开发一对抗独特型抗体	针对两个单特异性元件的可变区开发一个多抗

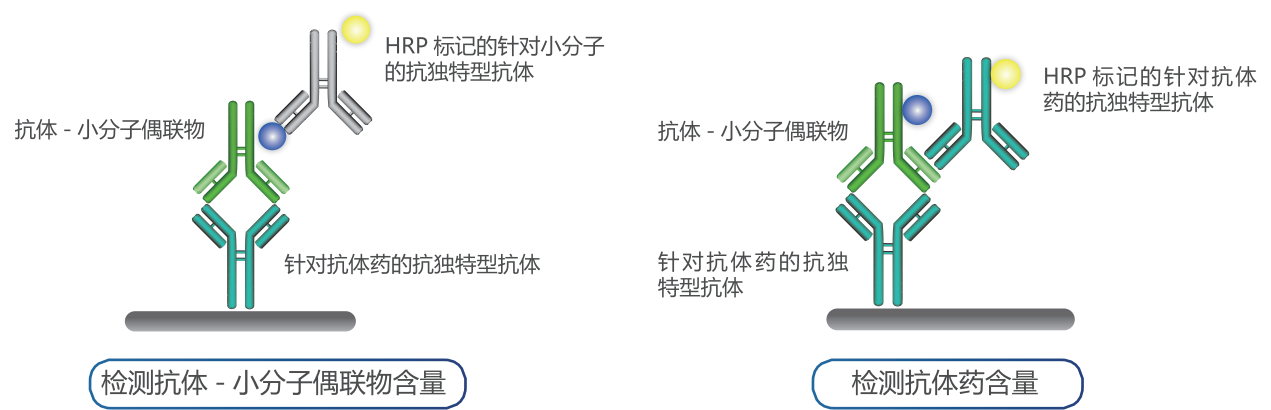
B 传统单抗及单域抗体药的 PK 及 ADA 检测方法

用途	待测物	酶联免疫检测方法及工具
PK	完整抗体	- ELISA (ligand binding assay, LBA) - 针对抗体药的配对的抗独特型抗体
ADA	完整抗体	- ELISA (ligand binding assay, LBA) - 针对整个单抗的抗独特型多抗



C ADC 类药物抗独特型抗体开发策略

典型 PK 检测方法示意图



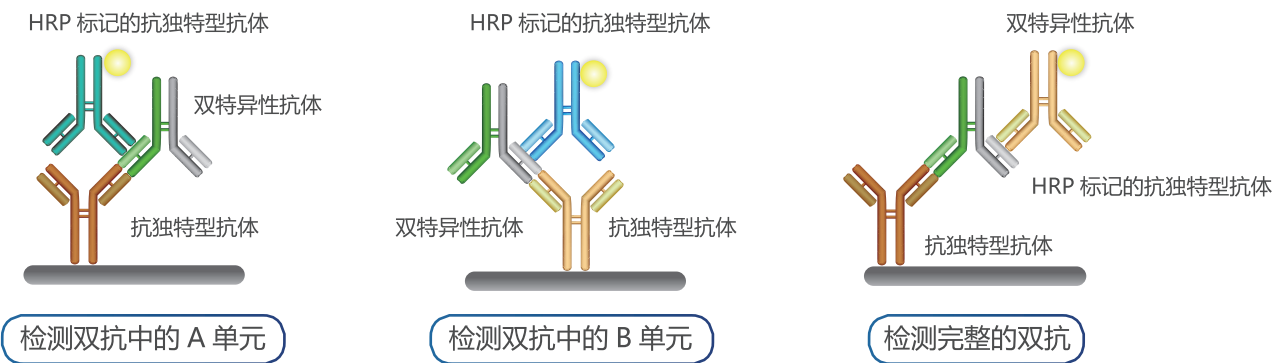
PK 及 ADA 检测方法

用途	待测物	典型检测方法及试剂
PK	抗体 - 小分子偶联物	• ELISA (ligand binding assay, LBA) • 配对的独特型抗体，分别针对抗体药及小分子
	抗体	• ELISA (ligand binding assay, LBA) • 配对的独特型抗体，均针对抗体药
	游离的小分子	• LC-MS
ADA	抗体 - 小分子偶联物	• ELISA (ligand binding assay, LBA) • 针对整个 ADC 的抗独特型多抗



D ADC 双抗类药物抗独特型抗体开发策略

典型 PK 检测方法示意图



ADA 及 PK 检测方法

用途	待测物	典型检测方法及试剂
PK	完整双抗	- ELISA (ligand binding assay, LBA) - 配对的独特型抗体，分别针对双抗的两个单元
	双抗 A 单元	- ELISA (ligand binding assay, LBA) - 配对的独特型抗体，均针对双抗的 A 单元
	双抗 B 单元	- ELISA (ligand binding assay, LBA) - 配对的独特型抗体，均针对双抗的 B 单元
ADA	完整双抗	- ELISA (ligand binding assay, LBA) - 针对整个双抗

应用策略

A 抗独特型单抗的类型

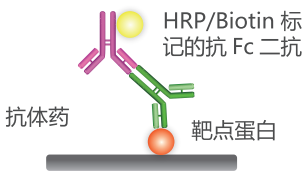
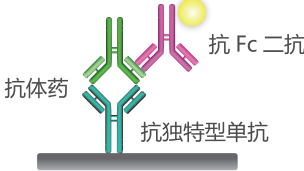
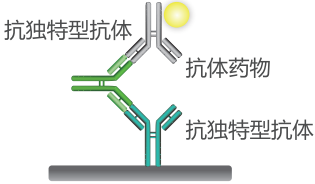
a.1 针对膜靶点的抗体药检测

对于针对膜靶点的抗体药，血清中仅存在一种类型的抗体药即游离型抗体药。因此阻断型或非阻断型抗独特型抗体均可以用到抗体药水平的检测中，无特殊需求无需开发特定类型的抗独特型抗体。

a.2 针对可溶性靶点的抗体药检测

对于针对可溶性靶点的抗体药，血清中存在抗原结合型及游离型两种类型的抗体药。因此，通常需要开发非阻断型抗独特型抗体用于抗体药总量的检测，同时开发阻断型抗独特型抗体用于游离型抗体药的检测。

B 药代动力学典型分析方法

	抗原捕获型	独特型抗体捕获型	夹心型酶联免疫分析方法
检测示意图			
固相包被	靶点蛋白	抗独特型抗体	抗独特型抗体
待测物	抗体药	抗体药	抗体药
检测抗体	抗 Fc 二抗	抗 Fc 二抗	抗独特型抗体
优点	- 无需额外开发抗独特型抗体 - 方案简单，节省时间	- 仅需开发一个独特型抗体 - 节省开发成本	- 特异性强 - 准确度高 - 适用于所有类型的生物药
缺点	- 准确度低 - 稳定性差	- 特异性一般，易受基质效应影响 - 仅适合有 Fc 区域的抗体药物	开发难度高

典型的药代动力学检测方法主要分为以上三种。由于抗原捕获型检测方法中抗原包被后所暴露出的表位变化大，且抗原稳定性较差等因素导致检测的准确度及稳定性都较低。因此，此方法仅推荐用于早期的探索型实验。捕获型及夹心型酶联免疫分析方法均为临床及临床前药代动力学分析的常见方法，可根据药物的类型，独特型抗体实际的开发情况进行选择。总体来说夹心型酶联免疫分析方法特异性最强，数据的准确度最高，可适用于所有类型生物药的检测。

C 药代动力学检测试剂盒开发

药代动力学分析方法类型选择完毕之后即可进行试剂盒的开发。

首先，需进行开发前的可行性研究，包括抗体标记、抗体配对和确认、标准曲线的初步确立、基质验证和初步灵敏度实验。对于夹心型酶联免疫分析，建议在抗独特型抗体发现阶段筛选出多对抗体，并选择配对效果最好的抗体对进行方法学开发，以保证试剂盒开发的成功。基质验证和灵敏度应根据不同待测样品的特性设立不同的标准，进行定制化设计。

接下来，需要对试剂盒反应条件及参数进行优化，确定标准曲线。

开发完成后，参考《生物样品定量分析方法验证指导原则》、《Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry》、《治疗性蛋白药物临床药代动力学研究技术指导原则（征求意见稿）》，对标曲一致性、灵敏度和最低检测限、批间差、批内差、添加回收率（80%-120%）、稳定性等试剂盒性能进行验证。按照金斯瑞蓬勃生物的开发经验，批间差可以控制在15%以内，批内差10%以内。

最后，遵循《GB/T 33411-2016 酶联免疫分析试剂盒通则》和《YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法试剂（盒）》进行试剂盒的生产。

对于开发好的试剂盒，需求方需根据上文提到的相关指导原则要求在合适的实验环境中对试剂盒进行验证，验证通过后方可进行临床样本检测。

参考规定或指南总结

《生物样品定量分析方法验证指导原则》

《Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry》

《治疗性蛋白药物临床药代动力学研究技术指导原则（征求意见稿）》

《GB/T 33411-2016 酶联免疫分析试剂盒通则》

《YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法试剂（盒）》

D 免疫原性分析

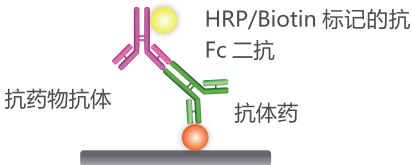
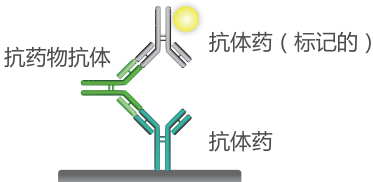
d.1 抗药物抗体检测

免疫原性分析中，通常会要求对抗药物抗体总量进行定量分析。由于抗独特型抗体与抗药物抗体的相似性，抗独特型多抗常作为检测的阳性对照。

d.2 中和型抗体分析

中和型抗体可以阻断抗体药物跟药物靶标的结合，中和掉抗体药的活性。临床前及临床免疫原性分析中，常要求结合药效的结果对动物及人体内产生的中和型抗体进行分析，评估其对药效的影响。可开发在药物靶标存在的竞争环境下依然可以阻断药物靶标及抗体药结合的全中和型抗独特型抗体作为阳性对照，结合药效模型对中和抗体进行定量分析。

E 免疫原性分析典型方法

	抗体药捕获型	桥联型
检测示意图		
固相包被	• 抗体药	• 抗体药
待测物	• 抗药物抗体	• 抗药物抗体
检测抗体	• 抗 Fc 二抗	• 抗体药
优点	• 易开发	• 准确性高
缺点	• 需更换检测抗体，准确性一般 • 易受基质影响 • 只适用于检测动物血清	• 线性范围窄 • 开发难度大

针对抗药物抗体总量检测的典型酶联免疫检测方法有抗体药捕获及桥联两种方式来建立检测的标准曲线。针对抗体药捕获型检测方式，需根据待测物的 Fc 类型来更换检测抗体的类型，对于数据的准确性会造成一定的影响（一般用于作为阳性对照）。总体来说，桥联型检测方法的准确度更高，但方法学建立难度也相对较大。



F 免疫原性检测试剂盒开发

免疫原性分析方法类型选择完毕之后即可进行试剂盒的开发。

与药代动力学检测试剂盒开发过程类似，免疫原性检测试剂盒开发也包括开发前的可行性研究（抗体标记、抗体标准曲线的初步确立、基质验证和初步灵敏度实验），优化试剂盒反应条件及参数，确定标准曲线和试剂盒的性能验证，最后进行试剂盒的生产。

同样的，基质验证和灵敏度应根据不同待测样品的特性设立不同的标准，进行定制化设计。并且对于免疫原性检测试剂盒，按照金斯瑞蓬勃生物的开发经验，批间差同样可以控制在 15% 以内，批内差 10% 以内。

开发过程中的参考规定和指南见下方总结。

对于开发好的试剂盒，同样的，需求方需根据下面列出的相关指导原则要求在合适的实验环境中对试剂盒进行验证，验证通过后方可进行临床样本检测。

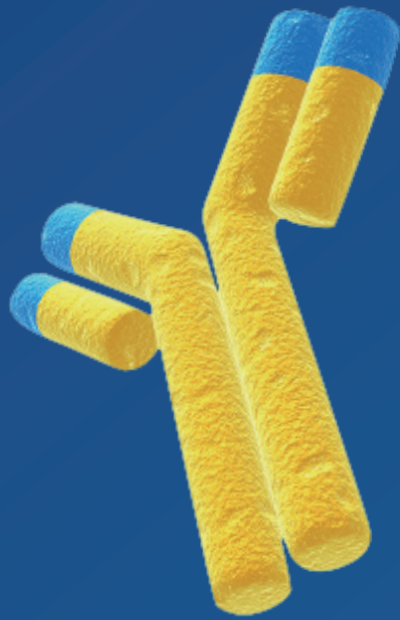
参考规定或指南总结

《GB/T 33411-2016 酶联免疫分析试剂盒通则》

《YY/T 1183-2010 酶联免疫吸附法试剂（盒）》

《药物免疫原性研究技术指导原则（征求意见稿）》

《Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products-Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection》



Anti-Idiotpe Antibody
Development
Application

江苏省南京市江宁科学园雍熙路 28 号

邮编 / 211100

电话 / 025-58897288-3172

传真 / 025-58897288-5815

邮箱 / cdmo@genscript.com