

依那西普(恩利®)检测试剂盒（酶联免疫法）

【产品名称】

通用名称：依那西普(恩利®)检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名称：Etanercept (Enbrel®) ELISA

【包装规格】96 人份/盒

【预期用途】

用于体外定量测定人血清或血浆中游离依那西普(恩利®)浓度。仅用于体外诊断。

【概要说明】

资料显示，依那西普(恩利®)是一种二聚体融合蛋白，由人 TNFR(肿瘤坏死因子受体) p75 亚基的胞外配体结合域和人 IgG1 Fc 段融合产生。组成依那西普的 Fc 包括 CH2、CH3 及连接部位，但不包括 IgG1 的 CH1 部分。依那西普包含 934 个氨基酸，分子量约为 150 kD。依那西普特异性结合肿瘤坏死因子 (TNF)，阻断它与细胞表面 TNF 受体的交叉反应。类风湿关节炎、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎及 斑块状银屑病患者的相关组织和流体中出现 TNF 水平升高。TNF (TNFRs) 有两类不同的受体，分别为 55 kD 的蛋白 (P55) 和 75 kD 的蛋白 (P75)，它们均以单体可溶解的形式存在于细胞表面。TNF 的生物活性取决于它与细胞表面两类受体分子的结合。依那西普是 p75 TNF 受体的二聚体可溶解形式，可与两种 TNF 分子结合。依那西普可抑制 TNF- α 和 TNF- β (淋巴毒素- α , LT- α) 与细胞表面 TNFRs 结合，表现为 TNF 生物学上无活性。

通过一个单次 SC 注射至 25 例 RA 患者 25mg 依那西普(恩利®)给予后,观察到一个均数 \pm 标准差半衰期的 102 ± 30 小时与一个清除率 160 ± 80 mL/hr。在一个单次 25 mg 剂量后在这些患者中观察到一个最高血清浓度(Cmax)为 11 ± 0.6 mcg/mL 和至 Cmax 时间为 69 ± 34 小时。在这些相同 RA 患者中在 6 个月每周 2 次 25 mg 剂量后,均数 Cmax 为 2.4 ± 1.0 mcg /mL(N = 23)。随着重复给药患者表现出在血清峰浓度一个 2-至 7-倍增加和 AUC0-72 hr 约 4-倍增加(范围 1-至 17-倍)。在 PsO 患者中的药代动力学参数与 RA 患者类似。

在另外一项研究中,有 RA 患者用 50 mg 依那西普每周 1 次治疗和与用 25 mg 依那西普每周 2 次治疗患者在稳态时血清浓度图形是有可比性。对用 50 mg 依那西普每周 1 次治疗患者(N = 21),均数(\pm 标准差) Cmax, Cmin, 和部分 AUC 分别为 2.4 ± 1.5 mcg /mL, 1.2 ± 0.7 mcg /mL, 和 297 ± 166 mcg \cdot h/mL; 而对用 25 mg 依那西普每周 2 次治疗患者(N = 16),分别为 2.6 ± 1.2 mcg /mL, 1.4 ± 0.7 mcg /mL, 和 316 ± 135 mcg \cdot h/mL。没有进行正规药代动力学研究检查肾或肝受损对依那西普处置的影响。

有幼年特发性关节炎(JIA)患者(年龄 4 至 17 岁)被给予 0.4 mg/kg 的依那西普每周 2 次,共至 18 周。重复 SC 给药后均数血清浓度为 2.1 mcg /mL, 有一个范围 0.7 至 4.3 mcg /mL。受限制数据提示在年龄 4 至 8 岁儿童中依那西普的清除率轻微减低。群体药代动力学分析预测在 JIA 患者方案中 0.8 mg/kg 每周 1 次对比 0.4 mg/kg 每周 2 次,稳态时出现 Cmax 高出 11%, Cmin 出现降低 20%。同等级别的 JIA 患者药代动力学差别是与在成年 RA 患者中每周 2 次和每周方案间观察到的差别大小相同。

使用恩利®进行治疗的患者发生严重感染的风险增高,可能导致住院或死亡。使用恩利治疗时和治疗后,应严密监测患者感染症状和体征的变化,包括那些治疗前的潜伏性结核感染检测结果呈阴性而可能发生结核感染的患者。

有类风湿关节炎、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎及斑块状银屑病患者在多个时间点检测恩利®抗体水平。在有类风湿关节炎、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎及斑块状银屑病的成人患者中,约 6%血清检测到 TNF 受体部分或恩利®药物产品的其他蛋白组分抗体至少一次。这些抗体均报告为非中和性。使用恩利®治疗的 JIA 患者与那些成人 RA 患者的结果类似。

在 PsO 研究评价依那西普共至 120 周的暴露,在评估时间点 24, 48, 72 和 96 周测试阳性患者的百分率范围从 3.6%-8.7%,且全部是非-中和性。在研究期间测试阳性患者的百分率随时间增加;然而,这个发现的临床意义仍是未知。观察到抗体发展与临床响应或不良事件无明显相关。超出 120 周暴露依那西普免疫原性数据未知。

有 RA 患者在多个时间点采集血清样本检测自身免疫抗体。在 RA 研究 I 和 II 中,对抗核抗体(ANA)评价发生新阳性 ANA(滴度 $\geq 1:40$)患者的百分率,在用依那西普治疗患者中(11%)

比安慰剂-治疗患者(5%)更高。通过放射免疫分析发生新阳性抗-双-链 DNA 抗体患者的百分率也较高(15%的用依那西普治疗患者与之比较安慰剂-治疗患者 4%)和通过 *Crithidia luciliae* 分析(用依那西普治疗患者 3%与之比较安慰剂-治疗患者无)。长期采用依那西普治疗对自身免疫疾病发展的影响仍未知。此外, 采用依那西普治疗的患者可能生成与实验室检测试剂中的单克隆抗体发生交叉反应的抗体。

在维持治疗中, 依那西普血清浓度可用于预测临床治疗效果。它可用于监测维持治疗过程中的血液循环中的依那西普浓度, 显示直接或间接免疫原性因子及其他副作用。

在这种情况下, 采用可靠的与血清浓度相关的标志物鉴定方法具有重要意义, 可识别药物副作用反应(无)响应和风险因子, 及维持依那西普的最低有效浓度, 从而避免潜在副作用。

【检验原理】

依那西普检测试剂盒(酶联免疫法)是基于三明治原理制备, 校准品和待测样本加入至预包被游离依那西普(恩利®)特异性反应物的微孔板中, 孵育冲洗后再加入过氧化物酶偶联抗体(酶结合物), 与依那西普结合。孵育后, 冲洗微孔板。加入生色底物进行孵育发生显色反应。加入终止液终止反应后, 读取吸光度。颜色深度与样本中或校准品中的游离依那西普(恩利®)浓度成正比关系。结果可通过标准曲线获得。

【主要组成成分】

1. **STND** **A-E**-标准品:

4, 2, 1, 0.5 和 0 μ g/mL, 即用型。用于生成标准曲线, 含依那西普(恩利®)、人血清、稳定剂及<0.1% NaN₃。每瓶 0.3 ml, 共 5 瓶。

2. **MTP**-酶标板:

可拆卸, 孔内预包被反应物, 酶标板 12 \times 8 孔条。

3. **ASSAY BUF**检测缓冲液:

蓝色, 即用型, 含有蛋白和<0.1% NaN₃。每瓶 50 ml。

4. **HRP CONJ**-酶结合物:

红色, 即用型, 含辣根过氧化物酶和稳定剂。每瓶 12 ml。

5. **TMB SUBS**-TMB 底物:

即用型, 含有四甲基联苯胺(TMB), 每瓶 12 ml。

6. **TMB STOP**-终止液:

即用型, 含有 1N HCL, 每瓶 12 ml。

7. **WASHBUF CONC**-浓缩冲洗液:

20 \times , 含有吐温的缓冲液, 每瓶 50ml。

8. 封板膜: 2 片。用于孵育中封住微孔板。

9. **SLGP**: 半对数曲线图。用于生成标准曲线和结果计算。

【储存条件及有效期】

试剂在 2-8 $^{\circ}$ C 下保存可稳定至所标示的有效期。试剂盒储运时应远离高温或避免阳光直接照射。

未使用完的包被抗体的酶标板条应放回至有干燥剂的箔袋中, 将箔袋折好并密封, 2-8 $^{\circ}$ C 下可保存 8 周。

稀释后的冲洗液可在 2-8 $^{\circ}$ C 下保存长达 4 周。

试剂可能变坏的现象:

- 任何一个试剂中有反常微粒子出现。
- 曲线范围偏离正常位置。

【适用仪器】

适用于具有 450nm、650nm 波长的所有全自动、半自动酶标仪。

【样本要求】

采用血清或血浆(EDTA 或肝素)样本。避免溶血、黄疸和脂血样本。如样本出现混浊, 建议再离心一次以去除特殊颗粒材料。样本应避免阳光照射。样本收集后应尽快分离, 2-8 $^{\circ}$ C 下可保存 2 天, -20 $^{\circ}$ C 下可保存 6 个月。避免样本反复冻融。**整个实验应使用相同的样本类**

型。

注：依那西普（恩利®）注射后会掩盖血清或血浆样本中的依那西普抗体的存在，因此，抽血时间对于依那西普的检测很关键。推荐实验室在依那西普（恩利®）注射前抽血或依那西普（恩利®）注射 2 周后抽血。

【检验方法】

1. 自备材料：

- 1) 高精度移液器（高精度多道移液器，如EPPENDORF或类似的，CV值<3%）。
- 2) 校准尺。
- 3) 样本稀释管。
- 4) 洗瓶，全动或半自动洗板机
- 5) 酶标仪（波长450/650nm）
- 6) 双蒸水或去离子水，吸水纸，吸头及计时器。

2. 试剂准备：

1) 冲洗液（WASHBUF CONJ）：

以10mL浓缩洗液+200mL蒸馏水的比例(1:20)混合，加热至37℃下溶解晶体，充分混匀。2-8℃保存可稳定4周。

在检测操作前制备好冲洗液。

1) 样本稀释：

在样本稀释管中以体积比1：20的比例混合血清/血浆样本和检测缓冲液，如10μl 样本 + 190 μl 检测缓冲液。

注：如病人样本中依那西普（恩利®）浓度高于检测范围时，应标记为“>最高校准品”。结果不可被推算出。出现上述病人样本应采用检测缓冲液稀释后再重新进行检测。

检测前应将所有试剂恢复至室温，反复倒转使其混合均匀。

【产品性能指标】

1. 灵敏度

标准品 0 的最低检测水平为:0.5 μg/mL.

2. 特异性：

与天然血清免疫球蛋白无交叉反应。然而，患者在进行其他抗TNF抗体治疗时，如英夫利昔单抗（Remicade®）和/或依那西普（恩利®），如英夫利昔单抗（Remicade®）和阿达木单抗（修美乐®），浓度高达500 μg/mL. 时可观察到交叉反应。

3. 精密度

批内 CV: <20 % 依那西普范围 0.5-3 μg/mL.

批间 CV: <20 % 依那西普范围 0.5-3 μg/mL.

4. 回收率：

回收率≥90%，通过在正常人血清样本中添加已知浓度的依那西普来测定。

Spike Recovery (%)为 97%。

【参考文献】

1. Suffredini AF, Reda D, Banks SM, Tropea M, Agosti JM, Miller R., Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration.,J Immunol. 1995 Nov 15;155(10):5038-45.
2. Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, Benjamin E., Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. N Engl J Med. 1996 Jun 27;334(26):1697-702.
3. Trehu EG, Mier JW, Dubois JS, Sorce D, Klempner MS, Epstein M, Dinarello CA, Shapiro L, Kappler K, Ronayne L, Atkins MB., Phase I trial of interleukin 2 in combination with the soluble tumor necrosis factor receptor p75 IgG chimera. Clin Cancer Res. 1996 Aug;2(8):1341-51.
4. Murray KM, Dahl SL., Recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75) Fc fusion protein (TNFR:Fc) in rheumatoid arthritis. Ann Pharmacother. 1997 Nov;31(11):1335-8.

5. Breedveld F., New tumor necrosis factor-alpha biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Eur Cytokine Netw.* 1998 Sep;9(3):233-8.
6. Goldenberg MM., etanercept, a novel drug for the treatment of patients with severe, active rheumatoid arthritis. *Clin Ther.* 1999 Jan;21(1):75-87; discussion 1-2.
7. Jarvis B, Faulds D., etanercept: a review of its use in rheumatoid arthritis. *Drugs.* 1999 Jun;57(6):945-66.
8. Korth-Bradley JM, Rubin AS, Hanna RK, Simcoe DK, Lebsack ME., The pharmacokinetics of etanercept in healthy volunteers. *Ann Pharmacother.* 2000 Feb;34(2):161-4.
9. Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, Cawkwell GD, Silverman ED, Nocton JJ, Stein LD, Gedalia A, Ilowite NT, Wallace CA, Whitmore J, Finck BK., etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. N Engl J Med.* 2000 Mar 16;342(11):763-9.
10. Spencer-Green G., etanercept (Enbrel): update on therapeutic use. *Ann Rheum Dis.* 2000 Nov;59 Suppl 1:i46-9.
11. Mease PJ, Goffe BS, Metz J, VanderStoep A, Finck B, Burge DJ., etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet.* 2000 Jul 29;356(9227):385-90.
12. Murphy FT, Enzenauer RJ, Battafarano DF, David-Bajar K., etanercept-associated injectionsite reactions. *Arch Dermatol.* 2000 Apr;136(4):556-7.
13. Russell E, Zeihen M, Wergin S, Litton T., Patients receiving etanercept may develop antibodies that interfere with monoclonal antibody laboratory assays. *Arthritis Rheum.* 2000 Apr;43(4):944.
14. Skyttä E, Pohjankoski H, Savolainen A., etanercept and urticaria in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2000 Jul-Aug;18(4):533-4.
15. Ostrov BE., Beneficial effect of etanercept on rheumatoid lymphedema. *Arthritis Rheum.* 2001 Jan;44(1):240-1.
16. Childs LM, Goater JJ, O'Keefe RJ, Schwarz EM., Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner Res.* 2001 Feb;16(2):338-47.
17. Elkayam O, Yaron M, Caspi D., From wheels to feet: a dramatic response of severe chronic psoriatic arthritis to etanercept. *Ann Rheum Dis.* 2000 Oct;59(10):839.
18. Martini A., etanercept improves active polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2001 Mar-Apr;19(2):122-4.
19. Johnson CJ, Reilly KM, Murray KM., etanercept in juvenile rheumatoid arthritis. *Ann Pharmacother.* 2001 Apr;35(4):464-71.
20. Takei S, Groh D, Bernstein B, Shaham B, Gallagher K, Reiff A., Safety and efficacy of high dose etanercept in treatment of juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2001 Jul;28(7):1677-80.
21. Srivastava MD., Immunomodulatory effects of etanercept (TNFR:Fc) and its use in a patient with Crohn's disease. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2001 Jul;109(1-2):125-41.
22. Alldred A., etanercept in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Pharmacother.* 2001 Jul;2(7):1137-48.
23. Yazici Y, Erkan D, Kulman I, Belostocki K, Harrison MJ., Decreased flares of rheumatoid arthritis during the first year of etanercept treatment: further evidence of clinical effectiveness in the "real world". *Ann Rheum Dis.* 2002 Jul;61(7):638-40.
24. Massarotti M, Marasini B., Successful treatment with etanercept of a patient with psoriatic arthritis after adalimumab-related hepatotoxicity. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2009 Apr-Jun;22(2):547-9.
25. Aggarwal R, Manadan AM, Poliyedath A, Sequeira W, Block JA., Safety of etanercept in patients at high risk for mycobacterial tuberculosis infections. *J Rheumatol.* 2009 May;36(5):914-7. Epub 2009 Mar 30.
26. Jiménez-Puya R, Gómez-García F, Amorrinch-Campos V, Moreno-Giménez JC., etanercept: efficacy and safety. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009 Apr;23(4):402-5.
27. Altomare G, Ayala F, Berardesca E, Chimenti S, Giannetti A, Girolomoni G, Lotti T, Martini P, Peserico A, Guerra AP, Vena GA., etanercept provides a more physiological approach in the treatment of psoriasis. *Dermatol Ther.* 2008 Oct;21 Suppl 2:S1-14.
28. Barrera MV, Habicheyn S, Mendiola MV, Herrera Ceballos E., etanercept in the treatment and retreatment of psoriasis in daily clinical practice. *Eur J Dermatol.* 2008 Nov-Dec;18(6):683-7.
29. Laganà B, Picchianti Diamanti A, Germano V, Argento G, Ferlito C, D'Amelio R., Two-year follow-up in an early rheumatoid arthritis patient treated with etanercept: radiological involvement despite clinical remission. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2008 Oct-Dec;22(4):271-3.
30. Fee DB, Kasarskis EJ., Myasthenia gravis associated with etanercept therapy. *Muscle Nerve.* 2009 Jun;39(6):866-70.
31. Sendur OF, Turan Y, Berkiz IK, Tastaban E., Angio-oedema in a patient treated with etanercept for rheumatoid arthritis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009 Jun;104(6):488-90.
32. Porfyridis I, Kalomenidis I, Psallidas I, Stratakos G, Roussos C, Vassilakopoulos T, Stathopoulos GT., etanercept-induced pleuropericardial lupus-like syndrome. *Eur Respir J.* 2009 Apr;33(4):939-41.
33. Gubinelli E, Canzona F, Tonanzi T, Raskovic D, Didona B., Toxic epidermal necrolysis successfully treated with etanercept. *J Dermatol.* 2009 Mar;36(3):150-3.
34. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Inoue K, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Freundlich B, Suzukawa M., Postmarketing surveillance of the safety and effectiveness of etanercept in Japan. *J Rheumatol.* 2009 May;36(5):898-906.
35. Appleyard DV, Schiller JR, Ebersson CP, Ehrlich MG., Idiopathic chondrolysis treated with etanercept. *Orthopedics.* 2009 Mar;32(3):214.
36. Slobodin G, Kessel A, Peri R, Zaigraikin N, Rozenbaum M, Rosner I, Toubi E., etanercept impairs maturation of human monocyte-derived dendritic cells by inhibiting the autocrine TNFalpha-mediated signaling. *Inflammation.* 2009 Jun;32(3):146-50.
37. Jiménez-Puya R, Gómez-García F, Amorrinch-Campos V, Moreno-Giménez JC., etanercept: efficacy and safety. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009 Apr;23(4):402-5.
38. Russell E, Zeihen M, Wergin S, Litton T., Patients receiving etanercept may develop antibodies that interfere with monoclonal antibody laboratory assays. *Arthritis and Rheumatism.* 2000 Apr; 43(4): p 944.