



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109280687 A

(43)申请公布日 2019.01.29

(21)申请号 201710603627.X

(22)申请日 2017.07.23

(71)申请人 上海有临医药科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张衡路1000  
弄63栋

(72)发明人 陈秋宇 谭青乔

(51)Int.Cl.

C12Q 1/02(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种人血清中抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物中和抗体检测方法

(57)摘要

一种检测人血清中抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物中和抗体的方法,包括如下步骤:应用SK-BR-3细胞系作为靶细胞,研究药物生物活性;使用药物作为抗原免疫食蟹猴,使用药物F(ab)’2片段加强免疫,制备阳性多抗;应用SPE萃取技术对血清样本进行前处理,消除血清干扰,提高方法稳定性和药物耐受能力;基于药物活性方法开发中和抗体检测方法,应用于经处理后的血清样本中中和抗体的检测。本发明的方法源自基于细胞水平的生物活性方法,直接反映药物分子作用机理MoA;应用对药物作用更为敏感的SK-BR-3细胞,有利于方法灵敏度的提高;阳性对照抗体通过免疫非人灵长类制备,与真实样本的可比性更强;血清样本经前处理后再进行检测,检测结果更为稳定可靠。

A  
CN 109280687

CN

1. 一种检测人血清中抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物中和抗体的方法,包括如下步骤:

步骤一,应用SK-BR-3人乳腺癌细胞系作为靶细胞,研究药物增殖抑制活性,选择EC<sub>50</sub>左右浓度作为固定的药物浓度;

步骤二,使用药物作为抗原免疫食蟹猴,使用药物分子F(ab')<sup>2</sup>片段加强免疫,经药物亲和纯化制备多抗,用作阳性对照;

步骤三,应用固相萃取技术从人血清中提取ADA,消除基质干扰,提高药物耐受能力。

步骤四,人血清样本经步骤三处理后,检测抗药抗体中和活性。

2. 根据权利要求1所述的应用SK-BR-3作为靶细胞研究药物生物活性,其特征是,来源于人类乳腺癌细胞,细胞表面高表达HER2蛋白。其对药物作用非常敏感,细胞增殖抑制EC<sub>50</sub>在10 ng/mL左右。

3. 根据权利要求1所述的使用药物作为抗原免疫食蟹猴,制备阳性多抗,其特征是,免疫非人灵长类制备的多抗,与真实样本产生的抗药抗体具有较强可比性。初次免疫后,使用药物分子F(ab')<sup>2</sup>加强免疫,提高抗体中抗idiotype抗体的比例,从而提高阳性对照抗体的中和活性,同样有利于提高方法的灵敏度。

4. 根据权利要求1所述的人血清前处理方法,应用步骤三固相萃取技术定向萃取其中的ADA,可消除血清干扰,提高方法的稳定性;同时可提高方法的药物耐受能力,提高血药存在情况下检测结果的可信度。

5. 根据权利要求1所述的中和抗体检测方法,其特征是,该方法通过基于细胞水平的活性方法转换而来,直接反映药物作用机理(MoA),并且呈剂量-效应关系,分析结果在临幊上具有实际参考意义。

# 一种人血清中抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物中和抗体检测方法

## 技术领域

[0001]

本发明涉及一种抗体药物偶联物中和抗体检测方法,具体是一种基于细胞水平分析方法检测人血清中抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物中和抗体的方法。

## 背景技术

[0002] 抗体药物偶联物(ADC, Antibody-drug conjugate)是一种新型的治疗性蛋白药物,由三个部分组成,针对特定靶点的抗体,通过化学修饰的连接子(linker)与具有细胞毒性的分子药物共价结合而形成。ADC通过其抗体分子结构区域与肿瘤细胞表面过表达的抗原靶点结合,达到特定部位,而经过特殊设计的连接体保证了其在到达特定位点之前的稳定性,从而特异地释放小分子毒物。与抗原结合后,ADC刺激靶细胞发生内化作用而进入细胞。在胞内溶酶体作用下发生降解并释放小分子毒性药物。小分子药物在胞内与其特定靶点(如微管蛋白等)结合,通过抑制增殖、促进凋亡等发挥毒性作用杀死细胞。同时有些抗体存在抗肿瘤活性,如Kadcyla中曲妥珠单抗(trastuzumab)可与小分子药物DM1发挥协同作用。ADC通常用于肿瘤领域疾病的治疗,与传统的小分子化药相比,因具有靶向性强、毒副作用弱、半衰期长等优势,从而具有广阔的应用前景。

[0003] 作为一种蛋白药物复合物,ADC由于其分子结构的复杂性,给药物的免疫原性风险评估带来挑战。蛋白药物的免疫反应一般通过体液免疫途径介导,因此检测药物诱导产生的抗药抗体(Anti-drug antibody, ADA)成为免疫原性分析的重要指标。对于ADC药物而言,其免疫原性可能来自裸抗分子、linker、小分子药物以及偶联过程中产生的新位点(neo-epitope),而对确认为阳性的抗药抗体进行进一步的表位鉴定及中和抗体分析,可以帮助我们更好的理解并评价其免疫性质。蛋白药物的中和抗体(Neutralizing antibody, NAb)是指一类可以中和药物生物学活性的抗药抗体,直接影响药物的临床疗效。同时对于具有一定内源性的药物而言,中和抗体的产生也会带来严重的安全问题,因此中和抗体的分析也已成为法规的必然要求。据报道,Kadcyla大约有5% ADA阳性率,目前未出现中和抗体的报道。而分子结构中包含人鼠嵌合抗体的Adcetris,其ADA阳性率高达37%,且约有60%的ADA具有中和活性。

[0004] 本发明涉及一种抗人表皮生长因子受体2(HER2)单克隆抗体-MMAE(monomethyl auristatin E)偶联物中和抗体的检测方法,现有文献未见直接报道。对于ADC而言,其中和抗体检测方法推荐采用基于细胞的活性方法(Bonnie Wu等,AAPS Journal, Vol.18, No.6, 2016)。Debbie A. Murray等应用Promega ADCC受体生物活性试验开发了一种Herceptin中和抗体分析方法,ADCC(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)效应与很多单抗药物的作用机理(MoA)紧密相关,然而并不能反映ADC药物作用机理中受体介导的细胞内吞及小分子释放产生的毒性作用。BT474细胞是一种高表达HER2的人乳房导管癌细胞,其增殖抑制试验常用于抗HER2药物的活性分析(Grazia Arpino等,J Natl Cancer Inst

2007, 99)。G. Brockhoff 等人发现, 相对于另一种高表达HER2的人乳房腺癌细胞SK-BR-3细胞, BT474对于抗HER2抗体的治疗更为敏感 (Cell Prolif. 2007, 40)。Gail D. Lewis Phillips 等人比较了 trastuzumab-DM1 的细胞杀伤作用, 发现 SK-BR-3 比 BT474 细胞对 ADC 的细胞毒性作用更为敏感 (EC<sub>50</sub> 分别为 10~20 ng/mL 和 100~200 ng/mL), 而 BT474 细胞毒性试验的效应窗口似乎更宽一些 (Cancer Res 2008; 68: 22)。从 kadcyla 的药学审查资料 (1254270rig1s000PharmR) 中发现, 研究者应用 BT474 细胞用于体外生物学活性的放行检测。然而如果基于该细胞开发中和抗体检测方法, 考虑其对 ADC 药物的敏感性相对较低, 选择 EC<sub>50</sub> 浓度作为药物的固定浓度时, 相应地方法的灵敏度就会大打折扣。同时样品中血清及药物存在也会对检测结果的可信度带来挑战。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的在于, 提供一种灵敏可靠的人血清中抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物中和抗体检测方法。本发明的方法应用SK-BR-3细胞, 提高方法的灵敏度。且本方法应用了一种血清样品前处理方法, 旨在消除基质干扰, 同时提高方法的药物耐受能力, 保证检测结果稳定可靠。

[0006] 与现有技术相比, 本发明具有如下的有益效果: 本发明应用SK-BR-3细胞作为靶细胞, 相比 BT474 细胞, 其对抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物更为敏感, 进行中和抗体方法开发时, 选择较低的 EC<sub>50</sub> 浓度作为药物的固定浓度, 可以改善方法的灵敏度。同时本发明使用抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物免疫食蟹猴制备阳性对照抗体, 与真实样本产生的抗药抗体具有较强可比性。初次免疫后, 使用药物分子 F(ab)<sup>2</sup> 加强免疫, 提高抗体中抗 idioype 抗体的比例, 从而提高阳性对照抗体的中和活性, 同样有利于提高方法的灵敏度。采用固相萃取技术 (SPE) 定向萃取人血清中的 ADA 组分, 可消除血清基质的干扰, 同时提高方法的药物耐受能力, 提高血药存在情况下检测结果的可信度。

[0007] 以下实例将对本发明进一步说明。本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施, 给出了详细的实施方式和过程, 但本发明的保护范围不限于下述的实施例。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 或按照试剂厂商所建议的条件。

[0008] 本实施例中涉及到的实验, 操作过程如下:

### 实施例1

#### SK-BR-3细胞培养及增殖抑制实验

根据需要使用适宜规格的培养瓶或培养皿培养 SK-BR-3 细胞 (ATCC, HTB-30<sup>TM</sup>)。以 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶 (Corning, 430641) 为例, 该细胞传代过程如下: 弃去培养基, 使用无菌磷酸盐缓冲液 (以下简称 PBS) 清洗瓶壁 (含细胞层) 一次。向瓶中加入 1.5~2 mL 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, 25200056) 溶液, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中消化约 3 分钟。取出培养瓶, 在倒置显微镜下观察细胞状态, 当细胞边缘变为椭圆形并开始脱落时, 轻拍瓶壁帮助细胞脱落, 然后加入 6~8 mL 完全培养基终止消化。完全培养基通过向 RPMI-1640 (Gibco, 31800022) 培养基中加入 10% FBS (Gibco, 10099141) 混合而成。根据传代比例弃去多余细胞悬浮液, 向剩余细胞悬浮液中补足完全培养基至约 15 mL。如需更换培养瓶, 则按照传代比例吸取细胞悬浮液至新培养瓶中, 向新瓶中补足完全培养基至约 15 mL。该细胞常用的传代比例为 1:2~1:4, 传代周期为每周 2~3 次。传代后细胞置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

[0009] 该细胞增殖抑制实验过程如下：在倒置显微镜下观察，当单层细胞密度达到培养瓶约70%~80%时，按照上述方法进行消化。取约1mL细胞悬浮液，使用细胞活力分析仪进行计数。离心剩余细胞悬浮液，去除Trypsin-EDTA。使用完全培养基重悬细胞至细胞密度为 $1*10^5/\text{mL}$ ，向96孔细胞培养板（Corning, 3599）中每孔加入100 $\mu\text{L}$ 细胞悬浮液，然后置于37 °C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中平衡约4小时。使用培养基配制系列浓度药物溶液，每孔10 $\mu\text{L}$ 加入平衡后的96孔细胞培养板中，置于37 °C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养至约72小时。使用培养基配制CCK-8显色液（Dojindo, CK04），弃去板中培养液并拍干，每孔加入100 $\mu\text{L}$  CCK-8显色液，置于37 °C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养2~3小时。使用酶标仪读取OD<sub>450-650 nm</sub>，根据OD值及对应药物浓度拟合抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物对SK-BR-3细胞的增殖抑制效应曲线，如图1所示。选择药物终浓度10 ng/mL作为中和抗体试验中药物的固定浓度。

[0010] 图1 SK-BR-3细胞增殖抑制效应曲线

### 实施例2

#### 抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物阳性对照抗体制备

应用食蟹猴，以抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物作为免疫原，参考多克隆抗体的经典制备程序，采用免疫的方法制备阳性对照抗体。

[0011] 使用TiterMax ® Gold Adjuvant (Sigma, T2684) 作为免疫佐剂，与抗原混合制备乳化液制剂，多点皮下注射免疫食蟹猴（约4~6kg），免疫剂量为400 $\mu\text{g}$ 。初次免疫7天后开始监测血清中抗药抗体滴度，14天后使用药物分子F(ab')' 2片段作为抗原加强免疫。二免两周后静脉采血评估抗体效价，若抗体滴度低于1:50000，继续使用F(ab')' 2加强免疫，直至抗体滴度 $\geq 1:50000$ 时，麻醉动物后取全血分离血清，纯化制备阳性对照抗体。

[0012] 其中，猴血清中抗药抗体滴度检测方法如下：

将药物按1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度包被微孔板，封闭后制成固相抗原。加入空白稀释液和不同稀释度的待测血清样品，温育后再加入1:10000稀释的辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗人IgG Fab多克隆抗体（Sigma, A0293）。当待测样本中含有抗药抗体时，将形成“固相抗原—待检抗体—酶标二抗”复合物，复合物上连接的HRP催化TMB底物发生显色反应，生成蓝色产物，加入H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应后变为黄色。用酶标仪读取450 nm处吸光值，定义信噪比 $\geq 3$ 的最大稀释倍数为抗体滴度。

[0013] ' 2制备方法如下：

将药物经0.1M醋酸钠-醋酸缓冲液（pH4.0）透析过夜。胃蛋白酶（Roche, 10108057001）溶于相同缓冲液中，药物与胃蛋白酶按25:1比例混合，37 °C孵育约18小时，加入0.1M NaOH至pH 7.0左右终止反应。将酶解产物用0.01M Tris-HCl透析24小时以上，然后过DEAE-纤维素离子交换柱，用0~0.3 M NaCl溶液梯度洗脱，收集首峰成分，即得F(ab')' 2片段。

[0014] 血清分离方法如下：

将血液采集到没有添加任何抗凝剂的采血管中，并于温室放置30~60min以使血液凝固。然后在4 °C冷冻离心机上以1200g转速离心10min，收集上层淡黄色血清，暂存于装有干冰的容器之中，之后再转入超低温冰箱（ $\leq -65^{\circ}\text{C}$ ）保存。

[0015] 纯化血清制备阳性多抗方法如下：

(1) 药物偶联柱制备：用5 mL注射用水复溶100 mg药物冻干粉，然后加入5 mL 0.25M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>缓冲液（pH 9.0）。吸取适量CNBr琼脂糖凝胶FF填料（Sangon, C500099），洗涤表面溶

剂,用5倍体积上述缓冲液浸泡并洗涤一次。将5 mL填料加入药物溶液中,在25℃恒温摇床上,轻轻振荡偶联6~8小时。加入50 mg甘氨酸,再反应6小时以上封闭游离基团。将偶联后的填料装在柱子中,用5倍体积1M NaCl溶液清洗两次,再用5倍体积纯水冲洗两次,最后将填料保存于20%乙醇溶液中。

[0016] (2)药物亲和纯化制备多抗:应用GE AKTA Pure 25M纯化系统,装备药物偶联柱,对免疫猴血清进行亲和纯化。猴血清先用PBS (pH 7.4)按1:1比例稀释,经0.22μm滤膜过滤。使用PBS (pH 7.4)作为平衡缓冲液,20mM柠檬酸 (pH3.5)作为洗脱缓冲液,上样流速1 mL/min,洗脱流速1.5 mL/min。收集洗脱峰,用0.5M磷酸氢二钠调pH至约7.0。将洗脱后的蛋白使用5 mL Protein A亲和预装柱 (ACROBiosystems, MA-0422-C5)进一步纯化去除杂蛋白。使用PBS (pH 7.4)作为平衡缓冲液,20mM柠檬酸 (pH 3.0)作为洗脱缓冲液,上样流速1 mL/min,洗脱流速1.5 mL/min。收集洗脱峰,用0.5M磷酸氢二钠调pH至约7.0。纯化后的多抗蛋白读取A<sub>280</sub>,按照消光系数1.4计算蛋白浓度。分装后放入超低温冰箱(≤-65℃)保存,用于中和抗体试验阳性对照 (Positive control, PC) 的制备。

#### [0017] 实施例3

##### 固相萃取提取人血清中ADA

人血清样本的成分非常复杂,药物及其他内源性组分都可能干扰样本检测。对于生物样本分析方法而言,通常采用稀释液稀释的办法降低干扰,摸索可以消除基质效应的最小稀释倍数 (Minimum Required Dilution, MRD),但是对于基于细胞培养的中和抗体方法往往收效甚微。Krista M. McCutcheon等人采取Protein A/G柱层析法纯化血清中的免疫球蛋白,以此消除病人血清中的非特异性干扰物对cell-based中和抗体方法的影响 (Journal of Immunological Methods, 358, 2010),然而该方法并不能消除血药干扰。采用固相萃取技术 (SPE) 定向萃取其中的ADA组分,可消除基质干扰,同时提高方法的药物耐受能力,提高血药存在情况下检测结果的可信度。方法流程如图2所示:

##### 图2 固相萃取提取人血清中ADA流程图

具体说明如下:

用碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 将链霉亲和素 (Genscript, Z02043) 稀释至10μg/mL,每孔100 μL加入高吸附96孔板 (Corning, 9018),2~8℃包被过夜。包被完成后,倒掉包被液,轻轻拍干。每孔300μL加入I-Block™ 封闭液 (Thermo, T2015),25℃封闭约2小时,制备 Streptavidin (SA) plate。将150μL人血清样本与100μL 10μg/mL生物素标记药物混合,25 ℃,500rpm转速下孵育1.5~2小时。将该混合溶液转移至上述包被链霉亲和素96孔板中,25 ℃,500rpm转速下孵育约1小时。倒掉孵育后溶液,在超净台中每孔300μL加入无菌PBS洗板3次,轻轻拍干。每孔加入100μL 400mM醋酸(经0.22μm滤膜过滤), 25℃,500rpm转速下孵育约1小时,分离与药物分子结合的ADA。轻轻吸出90μL酸解液,加入30μL 1.5M Tris溶液(经0.22μm滤膜过滤)中和。经本方法处理后的溶液用于中和抗体的检测。

[0018] 生物素标记药物方法如下:使用EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation试剂盒 (Thermo, Cat#:21435) 方法标记药物。用PBS稀释药物至2 mg/mL,取5 mL药物溶液,加入135 μL 10mM Sulfo-NHS-LC-Biotin试剂,涡旋混匀后室温孵育60分钟。使用Zeba™ 脱盐离心柱 (Thermo, Cat#:89891),纯化标记后的药物溶液。剪去离心柱底部栓头,放入15 mL离心管中,1000 g转速下离心2分钟,除去保存缓冲液。然后加入2.5 mL PBS洗涤离心柱3次,1000

g转速下离心2分钟。最后一次弃掉PBS,将离心柱放入新的15 mL离心管中。吸取标记后的药物溶液,小心加入离心柱中央,1000 g转速下离心2分钟,收集流穿液。该流穿液即为经过纯化后的生物素标记药物溶液。

[0019] 实施例4

抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物中和抗体试验

按照实施例1方法将SK-BR-3细胞接种于96孔细胞培养板中,置于37 °C,5% CO<sub>2</sub>培养箱中平衡约4小时。使用混合空白人血清稀释阳性对照抗体制备一系列浓度的阳性对照溶液(PC),按照实施例3方法进行前处理。使用培养基配制220 ng/mL药物溶液。将药物溶液与经过处理后的PC溶液按照1:1比例混合,置于37 °C培养箱中孵育约2h。每孔加入10μL混合溶液至平衡后的96孔细胞培养板中,置于37 °C,5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养至约72小时。使用培养基配制CCK-8显色液(Dojindo,CK04),弃去板中培养液并拍干,每孔加入100μL CCK-8显色液,置于37 °C,5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养2~3小时。使用酶标仪读取OD<sub>450-650 nm</sub>,根据OD值及对应PC浓度拟合抗体中和曲线,如图3所示。该曲线表明,中和活性与抗体浓度呈剂量-效应关系,本方法可用于血清样本中中和抗体的检测。

[0020] 图3抗HER2单抗-MMAE偶联物NAb中和曲线

附图说明

图1 SK-BR-3细胞增殖抑制效应曲线

图2 固相萃取提取人血清中ADA流程图

图3抗HER2单抗-MMAE偶联物NAb中和曲线。

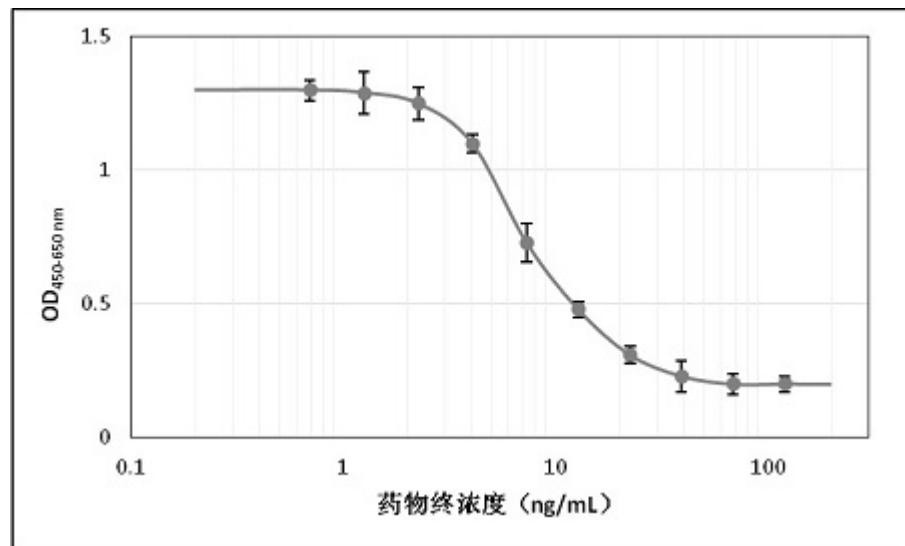


图1

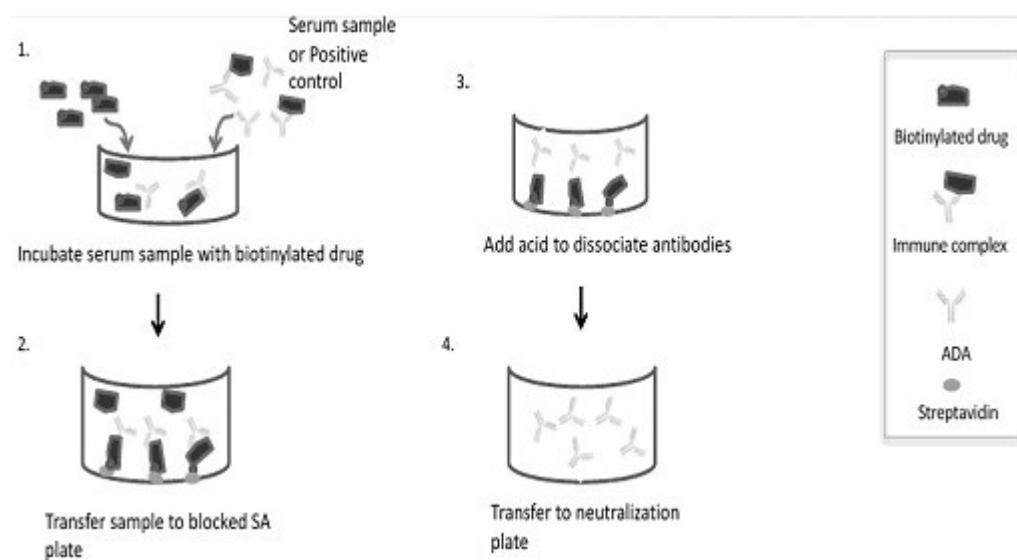


图2

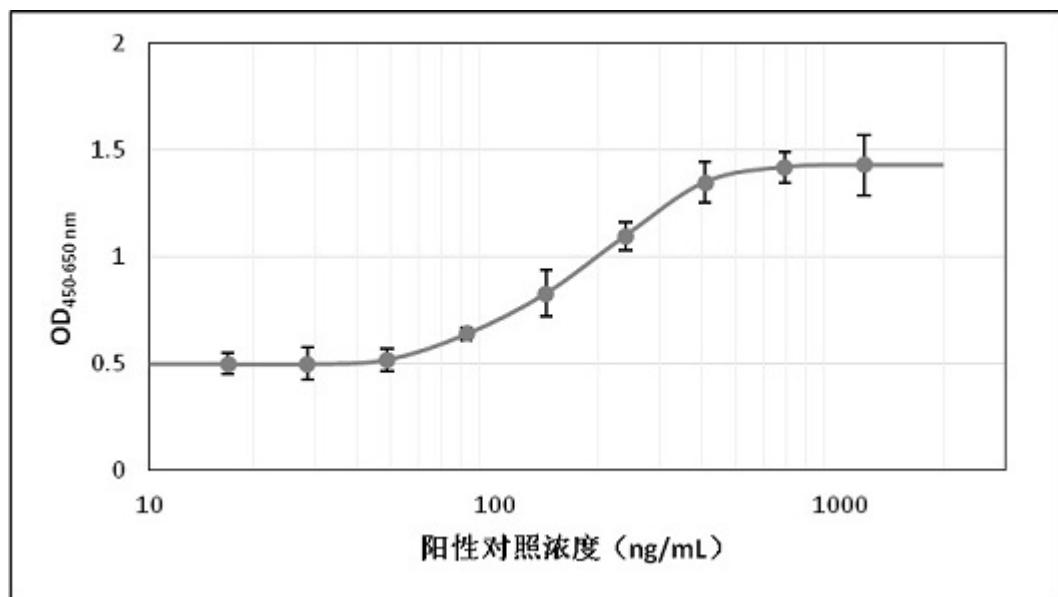


图3

专利名称(译)	一种人血清中抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物中和抗体检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109280687A</a>	公开(公告)日	2019-01-29
申请号	CN201710603627.X	申请日	2017-07-23
[标]发明人	陈秋宇 谭青乔		
发明人	陈秋宇 谭青乔		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5011 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

一种检测人血清中抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体-MMAE偶联物中和抗体的方法，包括如下步骤：应用SK-BR-3细胞系作为靶细胞，研究药物生物活性；使用药物作为抗原免疫食蟹猴，使用药物F(ab)'2片段加强免疫，制备阳性多抗；应用SPE萃取技术对血清样本进行前处理，消除血清干扰，提高方法稳定性和药物耐受能力；基于药物活性方法开发中和抗体检测方法，应用于经处理后的血清样本中和抗体的检测。本发明的方法源自基于细胞水平的生物活性方法，直接反映药物分子作用机理MoA；应用对药物作用更为敏感的SK-BR-3细胞，有利于方法灵敏度的提高；阳性对照抗体通过免疫非人灵长类制备，与真实样本的可比性更强；血清样本经前处理后再进行检测，检测结果更为稳定可靠。

