

利用实验设计优化和建立抗 CD38 单克隆抗体 ADCP 生物学活性测定方法

刘春雨^{1#}, 于传飞^{1#}, 李欣², 付志浩¹, 崔永霏¹, 郭璐韵¹, 王兰^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院单克隆抗体产品室, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室/国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629; 2. 广州市药品检验所, 广州 510160)

摘要: 利用实验设计 (design of experiment, DoE) 方法建立抗 CD38 单抗 (monoclonal antibody, mAb) 的抗体依赖性细胞吞噬作用 (antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP) 生物学活性检测方法。以 Jurkat/NFAT/CD32a-FcεRIγ 转基因细胞系作为效应细胞, Daudi 细胞系作为靶细胞, 通过荧光素酶检测系统 (BrightGlo™ Luciferase Assay system) 检测抗 CD38 单抗的 ADCP 生物学活性, 并运用 DoE 方法进行实验参数优化。结果显示, 抗 CD38 单抗在该方法中存在量效关系, 且符合四参数方程: $y = (A - D) / [1 + (x / C)^b] + D$, 方法经统计学实验设计对多个实验参数进行筛选和优化, 确定抗体工作浓度为 $800 \sim 20.81 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 靶细胞和效应细胞的接种量分别为每孔 7.5×10^4 和 2.5×10^4 个, 诱导时间为 6 h。该方法具有良好的专属性; 5 个不同组回收率样本经 3 次检测, 相对效价分别为 $(59.97 \pm 4.74) \%$ 、 $(82.44 \pm 5.15) \%$ 、 $(110.69 \pm 11.71) \%$ 、 $(129.23 \pm 5.22) \%$ 和 $(162.15 \pm 3.66) \%$; 回收率在 103%~120%, RSD 均小于 11%, 线性检测范围为 50%~150%。本研究利用 DoE 设计成功筛选、优化和建立基于报告基因的抗 CD38 单抗 ADCP 生物学活性测定方法, 该方法具有良好的专属性、重复性和准确性, 可作为抗 CD38 单抗 ADCP 生物学活性的评价方法。

关键词: 抗 CD38 单抗; 抗体依赖性细胞吞噬作用; 生物学活性; 实验设计; Plackett-Burman 设计; 优化; 验证

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2022)05-1459-06

A method for measuring the ADCP potency of anti-CD38 monoclonal antibody

LIU Chun-yu^{1#}, YU Chuan-fei^{1#}, LI Xin², FU Zhi-hao¹, CUI Yong-fei¹, GUO Lu-yun¹, WANG Lan^{1*}

(1. Division of Monoclonal Antibody, National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China; 2. Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

Abstract: A method to measure the antibody-dependent cell-mediated phagocytosis (ADCP) potency of anti-CD38 mAb was developed based on design of experiment (DoE) with a Jurkat/NFAT/CD32a-FcεRIγ transgenic cell line as the effector cell, the Daudi cell line as the target cells, and luciferase as the detection system. The DoE method was used for optimization of experimental parameters and methodological validation. The results show that anti-CD38 mAb exhibits a dose-response relationship with the following four-parameter equation: $y = (A - D) / [1 + (x / C)^b] + D$. Several experimental parameters were optimized by statistical experimental design and determined as follows: the working concentration of anti-CD38 mAb was $800 \sim 20.81 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, the density of the target

收稿日期: 2021-11-10; 修回日期: 2022-03-22.

基金项目: “重大新药创制”国家科技重大专项 (2018ZX09736-016-007); 中山市重大科技专项 (210204163866513).

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1613

cells was 7.5×10^4 per well, and the density of effector cells was 2.5×10^4 per well, with an induction time of 6 h. The method showed good specificity. The recovery rate for samples from 5 different groups showed that the relative potencies of anti-CD38 mAb were $(59.97 \pm 4.74) \%$, $(82.44 \pm 5.15) \%$, $(110.69 \pm 11.71) \%$, $(129.23 \pm 5.22) \%$ and $(162.15 \pm 3.66) \%$. The recoveries ranged from 103% to 120% and the RSDs of the above results were all less than 11%. The linear detection range was 50%–150%. Based on DoE design, this method for measuring ADCP potency of anti-CD38 mAb was optimized and validated with good specificity, repeatability and accuracy. This method can be used for evaluation of ADCP biological activity of anti-CD38 mAbs.

Key words: anti-CD38 monoclonal antibody; antibody-dependent cell-mediated phagocytosis; biological activity; design of experiment; Plackett-Burman design; optimization; validation

抗白细胞分化抗原 38 (cluster of differentiation 38, CD38) 是参与细胞的分化和活化的重要分子。CD38 分子是一种单链跨膜糖蛋白, 包括 N 端短的胞质尾、跨膜区和 C 端较长的胞外区, 能催化环腺苷二磷酸核糖 (cyclic ADP-ribose, cADPR) 的合成及降解^[1-4], 参与多种病理和 ryanodine 钙动员生理过程。CD38 通常在 T 细胞和 B 淋巴细胞分化的早期阶段及成熟的最后阶段表达, 而在成熟的中期阶段表达则缺失, CD38 可广泛检出于自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK)、树突状细胞 (dendritic cell, DC)、单核细胞 (monocyte) 和巨噬细胞 (macrophage)。因其可在淋巴细胞及骨髓等血液来源的恶性肿瘤细胞表面过度表达, 因此, 成为治疗多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM)^[5,6]、B 样弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (B-like diffuse large B-cell lymphoma, GCB-DLBCL)^[7] 及其相关淋巴细胞白血病^[8]、急性淋巴细胞白血病 (acute lymphocytic leukemia, ALL) 和急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML)^[9,10] 等血液肿瘤的理想靶分子。

抗 CD38 单克隆抗体 Daratumumab 已于 2019 年 7 月在国内获批上市, 临床疗效明显, 国内外多家企业也正在开展抗 CD38 单抗的研发。研究表明, 抗 CD38 单抗可以通过补体依赖的细胞毒作用 (complement dependent cytotoxicity, CDC) 和抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 以及抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 发挥其 Fc 效应子功能, 特异性杀伤肿瘤细胞^[11-15]。由于 ADCP 效应的评价方法难以建立, 在抗 CD38 单抗生物学活性的质量控制和评价研究中, 尚无 ADCP 活性的评价方法纳入质控, 因此需要探索和建立这一关键质量属性 (critical quality attributes, CQA) 的评价方法。实验设计 (design of experiments, DoE) 已被广泛应用于生物学产业及技术领域^[16-19], 尤其对于生物学方法建立过程中的实验条件筛选、优化及实验参数选择。利用 DoE 设计在降低工作量同时, 减少实验偏差, 并可高效分析各个参数之间是否存在交互

作用。实验方法的原理系以荧光素酶报告基因检测系统为平台, 以 Daudi 细胞为靶细胞、稳定转染 Fc γ RIIa 受体及 NFAT (nuclear factor of activated T-cells) 应答元件的 Jurkat 细胞为效应细胞, 待测抗体的 Fab 段识别靶细胞上的靶抗原表位 (CD38), 同时, 抗体的 Fc 段与效应细胞上的 Fc γ RIIa 结合, 激活 ADCP 作用机制通路, 转录因子 NFAT 启动荧光素酶报告基因的表达, 加入荧光底物后产生化学发光, 根据荧光素酶的表达量与抗体的浓度拟合剂量效应曲线, 得到半数有效浓度 EC₅₀ 值, 进而得到抗体药物的 ADCP 生物学活性。本研究利用 DoE 统计学实验设计方法, 高效优化实验参数, 建立并验证了抗 CD38 单抗的 ADCP 生物学活性测定方法。

材料与方 法

细胞系 Daudi 细胞系、Raji 细胞系和 Ramos 细胞系均为人淋巴细胞系, 购于 ATCC; Jurkat/NFAT/CD32a-Fc ϵ RI γ 效应细胞系 (稳定转染了 CD32a 分子, 即 Fc γ RIIa 的胞外区与 Fc ϵ RI γ 的胞内区的融合蛋白及 NFAT 反应元件) 和 Jurkat-NFAT 对照细胞系 (仅转染 NFAT 反应元件, 无 Fc γ RIIa 受体), 为本室构建。

供试品 抗 CD38 单抗, 抗 PD-L1 单抗, 抗 HER2 单抗, 均为本室留样。

试剂及仪器 RPMI1640 培养基 (含/不含酚红)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、遗传霉素 (G418) 及嘌呤霉素 (Puromycin) 购自 GIBCO 公司; 荧光素酶检测系统 (BrightGlo™ Luciferase Assay system) 购自 Promega 公司。SoftMax 5.4 分析软件为 Molecular Devices 公司产品; Design Expert 10.0 分析软件为 Statease 公司产品。酶标仪为 Perkin Elmer (珀金埃尔默, 美国) 公司的 Envision。

抗 CD38 单抗 ADCP 生物学活性检测方法 200 \times g 离心 5 min 收集靶细胞 (Daudi 细胞) 和效应细胞 (Jurkat/NFAT/CD32a-Fc ϵ RI γ 细胞) 后以稀释液 (含

0.5% BSA 的无酚红 RPMI1640 培养基) 重悬并调整细胞浓度分别为每毫升 3×10^6 和 1×10^6 个, 二者 1:1 混匀后以每孔 50 μL 接种 96 孔细胞板; 以稀释液将抗 CD38 单抗稀释至 $1.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (起始工作浓度为 $800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 再按 1:2 依次往下稀释, 共 10 个浓度, 以每孔 50 μL 加入 96 孔细胞板后 37°C 、5% CO_2 条件下孵育 6 h; 分别以每孔 100 μL 稀释液作为背景孔, 每孔 50 μL 稀释液及 50 μL 细胞混合液作为阴性对照孔; 细胞板平衡至室温后每孔加入 Bright-Glo 底物 100 μL 并用酶标仪读取相对光单位 (relative light unit, RLU); 利用 SoftMax5.4 软件分析数据, 以抗体工作浓度为 x 轴, 诱导倍数 (fold of induction, FI) 为 y 轴, 拟合四参数方程剂量效应曲线。FI = (反应孔 RLU 均值 - 背景孔 RLU 均值) / (阴性对照孔 RLU 均值 - 背景孔 RLU 均值), 四参数方程的 C 值即为半数有效剂量 (50% of maximal effect, EC_{50})。

实验参数优化 抗体工作浓度的优化: 以 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为单抗起始工作浓度按 1:2 倍稀释 27 个梯度。根据抗体浓度点在剂量效应曲线的上、下平台及线性部分的分布特点, 缩窄浓度范围进一步优化; 分别以 600、800 和 $1\,000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为起始, 1:2 倍稀释 10 个梯度; 以 $800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为起始, 分别 1:1.5、1:2 和 1:3 倍稀释 10 个梯度; 靶细胞种类的优化: 分别以 CD38 表达 (+) 的 Daudi 细胞、Raji 细胞及 Ramos 细胞作为靶细胞进行实验; 其他实验参数的优化: 利用 Design Expert 软件进行实验设计及统计学分析, 采用两步法进行优化。首先选用 Plackett-Burman 设计 (PB 设计) 挑选出对实验结果影响较大的实验参数; 再选用 optimal (custom) 设计方案对靶细胞数量、效应细胞数量及诱导时间进一步优化。

方法学验证 分别以稀释液和仅转染 NFAT 反应元件, 无 Fc γ RIIIa 受体的 Jurkat-NFAT 细胞系替代 Jurkat/NFAT/CD32a-Fc ϵ RI γ 效应细胞进行细胞专属性验证; 分别以稀释液及无关单抗 (抗 HER2 单抗和抗 PD-L1 单抗) 代替抗 CD38 单抗进行抗体专属性验证; 以起始工作浓度 $800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为 100%, 分别制备 50%、75%、100%、125% 和 150% 回收率样品, 独立检测 3 次。以另一独立稀释的 100% 样品为参比品, 按照参比品 EC_{50} /样品 $\text{EC}_{50} \times 100\%$ 计算各组相对效价及其均值、标准差 (standard deviation, SD) 和相对标准差 (relative standard deviation, RSD); 按照相对效价实测值/理论值 $\times 100\%$ 计算各组回收率及其均值、RSD 以验证准确性; 分别以 5 组样品相对效价的理论值为 x 轴, 实测值为 y 轴, 拟合回归直线并根据准确性、精密度和线性结果确定方法测定有效范围。

统计学实验设计方法 筛选实验 PB 设计: PB 设

计基于不完全平衡板块原理, 通过 n 个实验至多可研究 $(n-1)$ 个变量, 实验设计中通常预留虚拟变量以作为误差分析, 每个变量有两水平, 按照 PB 设计 2^{6-3} 方案, 共设 6 组变量, 包括靶细胞数量 (x_1)、效应细胞数量 (x_2)、诱导时间 (x_3)、稀释液 (x_4) 和两个虚拟变量 (x_5, x_6)。其中 x_1 和 x_2 的低水平 (-) 和高水平 (+) 分别为每毫升 1×10^6 和 6×10^6 个。 x_3 则为 3 和 30 h。 x_4 为稀释液 A (含 0.5% BSA 的无酚红 RPMI 1640 培养基) 及稀释液 B (含 1% FBS 的无酚红 RPMI 1640 培养基)。共执行 8 组方案, 见表 1。以窗口值 ($\text{FI}_{\max} - \text{FI}_{\min}$) 作为考察指标, Log_{10} 变量变换后进行统计学分析; 优化实验 optimal (custom) 设计: 根据 PB 设计的实验参数筛选结果, 确定进一步 optimal (custom) $4 \times 4 \times 4$ 优化方案, 3 组变量为靶细胞数量 (x_1)、效应细胞数量 (x_2) 诱导时间 (x_3), 每个变量有四水平, 分别记作 (-2)、(-1)、(+1) 和 (+2)。其中 x_1 和 x_2 的四水平分别为每毫升 5×10^5 、 1×10^6 、 3×10^6 和 6×10^6 个, x_3 则为 3、4.5、6 和 20 h。共执行 42 组方案, 见表 2。窗口值 Log_{10} 变换后分析数据, 并根据各组量效曲线 R^2 、窗口值等优化各实验参数。

Table 1 Implementation of Plackett-Burman (PB) design

Run	Target cell	Effector cell	Induction time	Dilution buffer
1	-	-	+	+
2	+	-	-	-
3	-	+	+	-
4	-	-	-	+
5	+	+	-	+
6	+	-	+	-
7	-	+	-	-
8	+	+	+	+

结果

1 抗 CD38 单抗的 ADCP 剂量效应关系

本研究建立的抗 CD38 单抗 ADCP 测定方法, 曲线在半对数坐标轴上呈典型的 S 型曲线, 符合四参数方程: $y = (A - D) / [1 + (x / C)^B] + D$ 。 $\text{EC}_{50} = 45.6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $R^2 = 0.999$ 。

2 实验参数优化

2.1 抗体工作浓度 不同的抗体起始工作浓度优化结果见图 1A, 不同稀释倍数优化结果见图 1B, 最终确定由 $800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 起始按 1:2 倍稀释, 共 10 个浓度点, 抗体工作浓度范围为 $800 \sim 20.81 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 靶细胞种类 分别以 CD38 表达 (+) 的 Daudi 细胞、Raji 细胞及 Ramos 细胞作为靶细胞进行 ADCP 实验, 最终确定靶细胞为 Daudi 细胞, 结果见图 2。

2.3 PB 设计实验参数筛选 按照表 1 所述方案筛选靶细胞数量 (x_1)、效应细胞数量 (x_2) 诱导时间 (x_3) 及稀

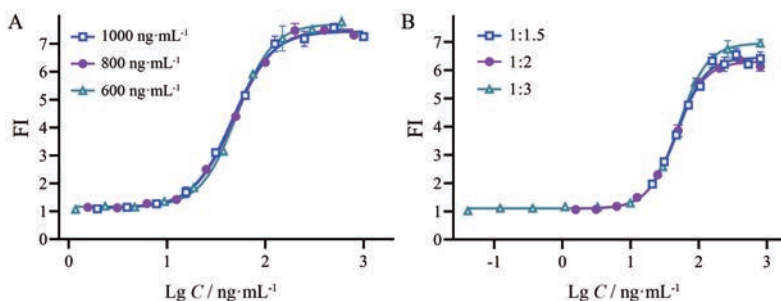


Figure 1 Dose-response curves of three different initial working concentration with two-fold dilution (A) and three different dilution folds with initial working concentration of 800 ng·mL⁻¹ (B) tested to optimize the working concentration of anti-CD38 mAb. FI: Fold of induction

Table 2 Implementation of optimal (custom) design

Run	Target cell	Effector cell	Induction time	Run	Target cell	Effector cell	Induction time
1	-2	+1	+1	22	-1	-1	-2
2	-2	+2	+1	23	+2	-2	+2
3	+2	+2	-1	24	-1	-1	+2
4	+1	+1	+2	25	-2	+2	-1
5	+2	-1	-2	26	+1	-2	-2
6	-2	+1	+2	27	+2	+2	-2
7	+1	-2	+1	28	-2	-1	-2
8	-2	+1	-2	29	+2	+2	+2
9	+2	+1	-2	30	-1	+1	-1
10	-1	+1	+1	31	+1	+1	-1
11	-2	-2	-2	32	-1	-2	-2
12	-1	-2	-1	33	-1	+2	+1
13	-2	-2	+2	34	+1	+2	+1
14	+2	-2	+1	35	+2	-1	+2
15	+1	+1	-2	36	+1	-1	-1
16	-1	+2	+2	37	+1	-1	+2
17	-1	-1	-1	38	+2	-2	-1
18	-2	-1	+1	39	+2	+1	-1
19	+1	+2	-2	40	+1	-1	+1
20	-1	-2	+1	41	+2	-1	+1
21	-2	-1	-1	42	-2	+2	+2

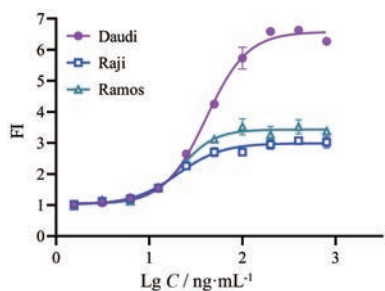


Figure 2 Dose-response curves of three different CD38 (+) cells as indicated to optimize the target cells

释液 (x_4), 因窗口值非正态分布, 对其进行 Log_{10} 变量变换后再进行统计学分析。方差分析结果显示, x_1 、 x_2 及 x_3 对实验结果的影响均具有显著性 ($P < 0.05$), 而 x_4 对实验结果的影响无显著性 ($P > 0.05$)。由残差正态图 (图 3A) 所见, 结果分布接近直线, 说明回归模型拟合效果良好, 线性回归方程式为 $y = 5.974\ 871 + 0.505\ 76x_1 +$

$0.925\ 741x_2 + 2.254\ 714x_3 + 0.073\ 476x_4$ 。由标准效应图 (图 3B) 所示, 参数越远离回归线, 则对结果影响越大, 反之亦然。因此, 认为稀释液非关键实验参数, 选择稀释液 A 进行后续实验; 而靶细胞数量、效应细胞数量、诱导时间则为关键实验参数, 需进一步优化。

2.4 optimal (custom) 优化实验参数 按照表 2 所述进一步优化 x_1 、 x_2 和 x_3 。方差分析结果显示, 三个实验参数对实验结果的影响均具有显著性 ($P < 0.05$) 而三者之间的两两交互作用无显著性 ($P > 0.05$)。所得结果中剔除曲线拟合效果不理想 ($R^2 < 0.95$) 组共获得 19 组剂量效应曲线。该 19 组实验参数设计及实验结果见表 3。根据 R^2 、窗口值选择 Run40 作为最终优化参数, 即靶细胞数量为每毫升 3×10^6 个、效应细胞数量为每毫升 1×10^6 个、诱导时间为 6 h。

3 方法学验证

3.1 专属性 结果显示, 无论稀释液、无 $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ 受体的 Jurkat-NFAT 对照细胞还是其他无关抗体 (抗 HER2

Table 3 Results from 19 groups of different implementation by optimal (custom) design

Run	Target cell ($\times 10^5$ per mL)	Effector cell ($\times 10^5$ per mL)	Induction time/h	R^2	Window value
4	30	30	20	0.971	4.26
5	60	10	3	0.972	1.95
7	30	5	6	0.969	7.63
9	60	30	3	0.972	2.70
14	60	5	6	0.987	11.19
15	30	30	3	0.995	1.64
19	30	60	3	0.993	2.01
22	10	10	3	0.962	0.75
26	30	5	3	0.960	2.08
27	60	60	3	0.996	3.38
29	60	60	20	0.982	3.03
34	30	60	6	0.947	5.09
35	60	10	20	0.955	3.94
36	30	10	4.5	0.982	5.80
37	30	10	20	0.987	3.33
38	60	5	4.5	0.998	8.17
39	60	30	4.5	0.999	8.72
40	30	10	6	0.996	9.65
41	60	10	6	0.994	9.44

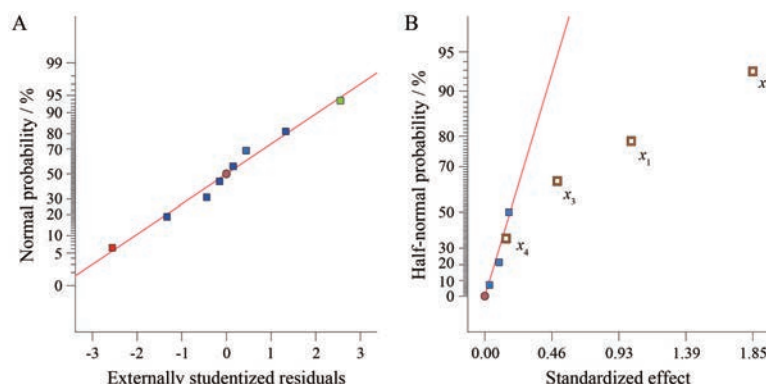


Figure 3 Statistical analysis results of normal plot of residuals (A) and normal plot of standardized effect (B) by PB (Plackett-Burman) design

单抗和抗PD-L1单抗), 都无法诱导产生ADCP反应, 证明该方法具有良好的专属性, 见图4。

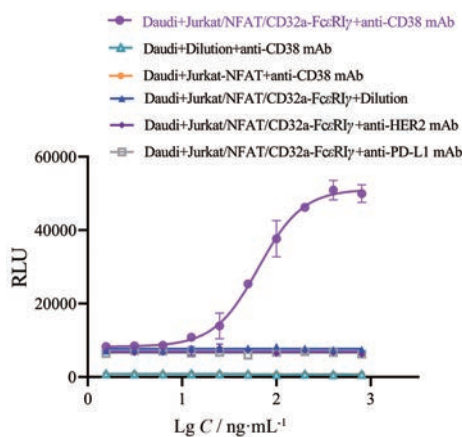


Figure 4 Specificity of ADCP potency for anti-CD38 mAb. Different negative controls of effector cells and mAbs as indicated were subject to the established bioassay, and only the intact anti-CD38 mAb incubated together with Daudi cell and Jurkat/NFAT/CD32a-FcεRIγ cell showed the dose-response curve. RLU: Relative light unit

3.2 精密度与准确性 5组回收率样品的相对效价分别为 $(59.97 \pm 4.74)\%$ 、 $(82.44 \pm 5.15)\%$ 、 $(110.69 \pm 11.71)\%$ 、 $(129.23 \pm 5.22)\%$ 和 $(162.15 \pm 3.66)\%$; 回收率在103%~120%之间, RSD均小于11%, 表明该方法的精密性与准确性良好。

3.3 线性与范围 5组样品的理论相对效价与实测相对效价线性回归拟合方程式为 $y = 1.0046x + 8.4332$, $R^2 = 0.9939$, 说明线性拟合较好。根据准确性、精密度和线性的结果, 本方法测定的范围为50%~150%。

4 不同抗CD38单抗的ADCP活性检测

分别对3株不同来源的抗CD38单抗均可诱导产生ADCP反应, 说明本方法可应用于不同CD38靶点单抗的ADCP活性评价, 见图5。

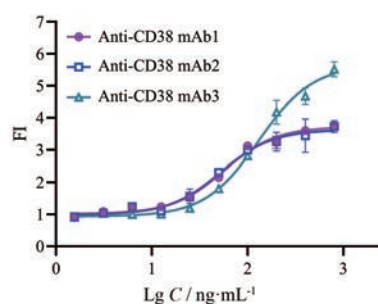


Figure 5 Dose-response curves of three different anti-CD38 mAbs tested by the established method for the evaluation of antibody-dependent cell-mediated phagocytosis (ADCP) bioactivity

讨论

随着免疫学的发展和对肿瘤临床研究的深入, 新靶点的抗肿瘤药物不断涌现, 目前, 针对CD38靶点的单抗药物渐渐成为研发热点。生物学活性是反映单抗药效的最重要指标, 因此建立单抗的体外生物学活性评价方法是单抗质控实验室的重要工作之一。抗CD38单抗的主要作用机制包括CDC、ADCC和ADCP, 可诱导表达CD38分子的恶性肿瘤发生肿瘤细胞溶解。但目前由于ADCP活性测定方法多为基于操作复杂且变异大的流式细胞术及原代细胞染色方法, 既难以建立也不适于放行, 因此在抗CD38单抗生物学活性的质量控制和评价研究中, 尚无ADCP活性的评价方法纳入质控。

根据前期的基础, 本研究将表达FcγRIIIa(胞外区)/FcεRIγ(胞内区)的融合蛋白及NFAT应答元件稳定转入Jurkat细胞, 构建了一株转基因效应细胞株^[20], 其中, FcγRIIIa与抗CD38单抗的Fc端结合, 而FcεRIγ则负责将结合后的胞内信号转导引发后续诱导效应。本方法经抗体量效范围、靶细胞种类、细胞数量、诱导时间等实验参数优化, 得到良好的S型剂量效应曲线。按照ICH-Q2(R1)进行验证^[21], 证明该方法具有良好的专属性、精密性和准确性, 线性检测范围为50%~

150%。本方法也可应用于检测不同抗CD38单抗样品的ADCP活性。

基于DoE高效的统筹设计,本研究针对众多对影响实验结果可能造成影响的实验参数进行两步筛选及优化。PB设计理论是由Plackett和Burman于1946年建立的,目前已被广泛应用于抗体生产工艺参数的优化当中^[22,23]。本研究将PB设计方法引入实验参数的筛选中,首先设置4参数2水平共8组实验方案,最终筛选出靶细胞、效应细胞数量及诱导时间是结果影响有显著意义的实验参数。下一步是基于正交设计的optimal (custom) 4×4×4方案,理论需要执行64组实验,而根据DoE的设计方案,只需要执行42组实验,通过数据比较优选出理想的实验条件,并通过Design Expert软件分析检测结果,比较各个实验参数的影响及交互作用,并进行方差分析,提供统计学依据。在方法优化过程中,由于部分极限条件会导致量效曲线拟合不理想,因此,本研究以 $FI_{\max}-FI_{\min}$ 作为窗口值进行考察,又由于该窗口值不呈现正态分布,因此进行了以10为底的对数变量变换后进行统计学分析。

综上所述,本研究建立了灵敏、准确的ADCP测活方法,该方法周期短、信噪比高,为抗CD38单抗的工艺稳定性评价及结构与功能关系的研究奠定基础,保证了该类产品质量可控、安全可靠。

作者贡献:刘春雨负责实验设计、完成实验的主要部分、数据分析及文章撰写;于传飞负责构建实验思路、完成实验的主要部分及文章润色;李欣、付志浩、崔永霏、郭璐韵负责完成实验的优化及验证部分,王兰负责总体实验设计及文章润色。

利益冲突:无任何利益冲突。

References

- [1] Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, et al. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38 [J]. *Science*, 1993, 262: 1056-1059.
- [2] van de Donk NW, Janmaat ML, Mutis T, et al. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond [J]. *Immunol Rev*, 2016, 270: 95-112.
- [3] Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology [J]. *Physiol Rev*, 2008, 88: 841-886.
- [4] Campana D, Suzuki T, Todisco E, et al. CD38 in hematopoiesis [J]. *Chem Immunol*, 2000, 75: 169-188.
- [5] Krejčík J, Casneuf T, Nijhof IS, et al. Daratumumab depletes CD38⁺ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2016, 128: 384-394.
- [6] Lin P, Owens R, Tricot G, et al. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2004, 121: 482-488.
- [7] Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling [J]. *Nature*, 2000, 403: 503-511.
- [8] Brachtl G, Piñón Hofbauer J, Greil R, et al. The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Ann Hematol*, 2014, 93: 361-374.
- [9] Keyhani A, Huh YO, Jendiroba D, et al. Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia [J]. *Leukemia Res*, 2000, 24: 153-159.
- [10] Long J, Liu S, Li K, et al. High proportion of CD34⁺/CD38⁻ cells is positively correlated with poor prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55: 611-617.
- [11] Van DE Donk NW. Immunomodulatory effects of CD38-targeting antibodies [J]. *Immunol Lett*, 2018, 199: 16-22.
- [12] Franssen LE, Stege CAM, Zweegman S, et al. Resistance mechanisms towards CD38-directed antibody therapy in multiple myeloma [J]. *J Clin Med*, 2020, 9: 1195.
- [13] Weiskopf K, Weissman IL. Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer [J]. *Mabs*, 2015, 7: 303-310.
- [14] Offidani M, Corvatta L, Morè S, et al. Daratumumab for the management of newly diagnosed and relapsed/refractory multiple myeloma: current and emerging treatments [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 624661.
- [15] Zhu C, Song Z, Wang A, et al. Isatuximab acts through Fc-dependent, independent, and direct pathways to kill multiple myeloma cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1771.
- [16] Weuster-Botz D. Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search [J]. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90: 473-483.
- [17] Tye H. Application of statistical 'design of experiments' methods in drug discovery [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9: 485-491.
- [18] Rouiller Y, Périlleux A, Vesin MN, et al. Modulation of mAb quality attributes using microliter scale fed-batch cultures [J]. *Biotechnol Prog*, 2014, 30: 571-583.
- [19] Politis SN, Colombo P, Colombo G, et al. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43: 889-901.
- [20] Liu CY, Yu CF, Yang YL, et al. Development of a novel reporter gene assay to evaluate antibody-dependent cellular phagocytosis for anti-CD20 therapeutic antibodies [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100: 108112.
- [21] Yu CF, Huang J, Yang YL, et al. Collaborative study to evaluate a reporter gene assay for anti-PD-1 antibody bioactivity [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1010-1014.
- [22] González-Leal IJ, Carrillo-Cocom LM, Ramírez-Medrano A, et al. Use of a Plackett-Burman statistical design to determine the effect of selected amino acids on monoclonal antibody production in CHO cells [J]. *Biotechnol Prog*, 2011, 27: 1709-1717.
- [23] Agarabi CD, Schiel JE, Lute SC, et al. Bioreactor process parameter screening utilizing a Plackett-Burman design for a model monoclonal antibody [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104: 1919-1928.