·重大新药创制专项巡礼·

抗 EpCAM + CD3 双特异性抗体细胞生物学活性报告基因测定方法的建立和验证

张红梅[1,2],张　峰[2],刘春雨[2],于传飞[2],段茂芹[2],曹俊霞[2],黄　璟[2,3],王开芹[2],郭　潇[2],王　兰[2]

(1 烟台大学药学院,烟台 264005;2 中国食品药品检定研究院单克隆抗体产品室,卫生部生物技术产品检定方法及标准化重点实验室,北京 102629;3 沈阳药科大学,生命科学与生物制药学院,沈阳 110016)

[摘要] **目的:**建立基于细胞的抗 EpCAM + CD3 双特异性抗体(bispecific antibody, BsAb)生物学活性报告基因测定方法(reporter gene assay,RGA)。**方法:**构建稳定表达萤光素酶(luciferase, Luc)的 HcT116-Luc 细胞为靶细胞,以 HuT78 细胞为效应细胞,通过对样品浓度、孵育时间、细胞接种时间、效靶比和细胞接种密度进行优化建立报告基因法,根据人用药品注册技术要求国际协调会(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH)Q2 指导原则和《中华人民共和国药典》(2015)指导原则,对 RGA 法的特异性、准确性、精密度、线性、代次稳定性和耐用性进行验证。**结果:**建立 RGA 方法经优化后的检测条件:效靶比为 10∶1;细胞接种密度为 1.1×10^4 细胞·孔$^{-1}$;BsAb 样品以 3 000 ng·mL^{-1}为起始浓度 1∶3.5 向下稀释 9 个浓度梯度(共 10 个检测浓度);系列稀释样品与细胞孵育时间为 72 h。孵育结束后测定 Luc 强度并以 4-参数模式拟合剂量-效应曲线,计算样品相对生物学活性。建立 RGA 法的特异性、耐用性均符合应用要求。采用 50%,70%,80%,100%,120%,130%,150% 和 200% 共 8 个效价浓度进行准确性、精密度和线性验证,8 个效价浓度的生物学活性回收率在 95.48% ~107.37%,变异系数(coefficient of variation,CV)在 4.80% ~9.97%,均 <10%,实测效价与理论效价线性回归分析相关系数 $r^2>0.99$。第 14 ~33 代次 HcT116-Luc 细胞 Luc 表达情况稳定。**结论:**基于传代细胞建立的抗 EpCAM + CD3 BsAb 报告基因生物学活性测定方法操作简便,其特异性、精密度、准确性、耐用性方面符合应用要求,可作为此类双特异性抗体活性评价的方法,用于其质量控制中。

[关键词] 双特异性抗体;抗 EpCAM + CD3;生物学活性;报告基因法

[中图分类号] R915　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2021)01 - 0025 - 10

Development and validation of a cell-based reporter gene assay for bioactivity determination of anti-EpCAM + CD3 bispecific antibody

ZHANG Hong-mei[1,2], ZHANG Feng[2], LIU Chun-yu[2], YU Chuan-fei[2], DUAN Mao-qin[2], CAO Jun-xia[2], HUANG Jing[2,3], WANG Kai-qin[2], GUO Xiao[2], WANG Lan[2]

(1 *School of Pharmacy, Yantai University, Yantai* 264005, *China*; 2 *Division of Monoclonal Antibody, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing* 102629, *China*; 3 *School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang* 110016, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To develop a cell-based reporter gene assay (RGA) for bioactivity determination of anti-EpCAM + CD3 bispecific antibody (BsAb). **Methods**: A HcT116-Luc cell line stably expressing Luciferase

[基金项目] 国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2018ZX09101001-003)

[作者简介] 张红梅,女,硕士研究生,主要从事药物分析研究。E-mail:1129920097@qq.com。张峰,男,主任技师,主要从事抗体类生物治疗药物质量控制研究。联系电话:(010)53852178,E-mail:zhangfeng5122@163.com。

[通讯作者] 王兰,女,研究员,主要从事抗体类生物治疗药物质量控制研究。联系电话:(010)53852159,E-mail:wanglan@nifdc.org.cn。

(Luc) was generated as the target cell, and a HuT78 cell line served as effector cell. The RGA was established by optimizing the initial concentration of BsAb, incubation time, cell seeding time, the ratio of effector cell to target cell, and cell seeding density. The specificity, accuracy, precision, linearity, subculture stability and robustness of RGA were verified according to the guideline of International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q2 and Pharmacopoeia of the People's Republic of China (ChP, 2015). **Results**: The parameters of RGA were developed and confirmed after optimization as follows: The ratio of effector cell to target cell was 10∶1; After mixing effector cell and target cell, the mixed cells were seeded in 96-well plate with 1.1×10^4 cells·well^{-1}, which was cell seeding density; The initial concentration of BsAb, 3 000 ng·mL^{-1}, was serially diluted by 1∶3.5 for 9 gradients, and there were 10 detected concentrations in all; The serially diluted samples were incubated for 72 h with the seeding cells. After the incubation, the Luc intensity was measured, and the dose-response curve was fitted in a 4-parameter mode to calculate the relative bioactivity of sample. The accuracy, precision and linearity verification were performed by 8 potency concentrations, which were 50%, 70%, 80%, 100%, 120%, 130%, 150% and 200% potency concentrations. The recovery rate range of relative bioactivities of 8 potency concentrations was 95.48% ~107.37%, and the coefficient of variation (CV) ranged 4.80% ~9.97%, which was <10%. The measured potency to expected potency was evaluated by linear regressing model analysis (r^2 >0.99). The Luciferase was stably expressed in HcT116-Luc cell between 14 and 33 passage. **Conclusion**: Based on passage cells, the RGA has been developed as a simple and convenient procedure for determination of bioactivity of anti-EpCAM + CD3 BsAb, and its specificity, precision, accuracy and robustness met the application requirements.

[**Key words**] bispecific antibody; anti-EpCAM + CD3; bioactivity; reporter gene assay

双特异性抗体(bispecific antibody,BsAb)以可同时结合 2 种不同抗原或抗原表位的特性在临床上展现出广阔的发展前景[1-3]。目前 BsAb 技术平台已超过 60 个,设计、构建的 BsAb 结构超过 100 种,全球在研 BsAbs 超过 200 个,其中大部分在研 BsAbs 用于肿瘤和自身免疫性疾病的治疗。在抗肿瘤 BsAb 中,T 细胞招募型 BsAb(T cell-recruiting bispecific antibody)[4-9],可同时结合肿瘤特异性/相关抗原和 T 细胞表面的白细胞分化簇 3(cluster of differentiation 3,CD3)分子,将 T 细胞募集至肿瘤靶细胞以杀伤肿瘤细胞。catumaxomab 为该类 BsAb 的代表性品种,该 BsAb 为免疫球蛋白 G(immunoglobulin G,IgG)样结构,其可变区可分别特异性结合肿瘤细胞表面的上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule,EpCAM)和 T 细胞表面的 CD3 分子,可结晶片段(fragment crystallizable,Fc)可通过 Fc 受体招募自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)和巨噬细胞等固有免疫细胞增强对肿瘤细胞的杀伤[10]。2009 年 catumaxomab 被 EMA 批准用于治疗 EpCAM 阳性肿瘤引起的恶性腹水。

本研究的对象为 Y-body 结构的抗 EpCAM + CD3 BsAb,其作用机制与 catumaxomab 相同,其抗 EpCAM 端为正常抗原结合片段(fragment of antigen binding,Fab)结构,抗 CD3 端为与 Fc 融合的抗 CD3 轻链可变区(variable region of light chain,VL)经柔性肽与抗 CD3 重链可变区(variable region of heavy chain,VH)连接形成抗 CD3 单链抗体,2 个半抗体间借由 KIH(knob into hole)和离子桥方式形成异源二聚体[11],用于治疗 EpCAM 阳性肿瘤引起的恶性腹水。此类 BsAb 传统的生物学活性测定方法为基于外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的杀伤试验,该方法不仅操作复杂、耗时长,而且 PBMC 来源于志愿献血者,存在个体差异,导致方法存在精密度和耐用性不足等问题[12]。基于上述情况,急需建立简单快捷的生物学活性测定方法。本研究将基于抗 EpCAM + CD3 BsAb 的作用机制,建立基于传代细胞的报告基因法(reporter gene assay,RGA)用于测定抗 EpCAM + CD3 BsAb 生物学活性,并对其进行方法学验证。

材料与方法

1 细胞系

HcT116 细胞(ATCC® CCL-247)和 HuT78 细胞(ATCC® TIB-161)由本实验室保存;HcT116-Luc 细

胞系[稳定表达萤光素酶(Luciferase,Luc)报告基因]由本实验室构建。

2 药品与试剂

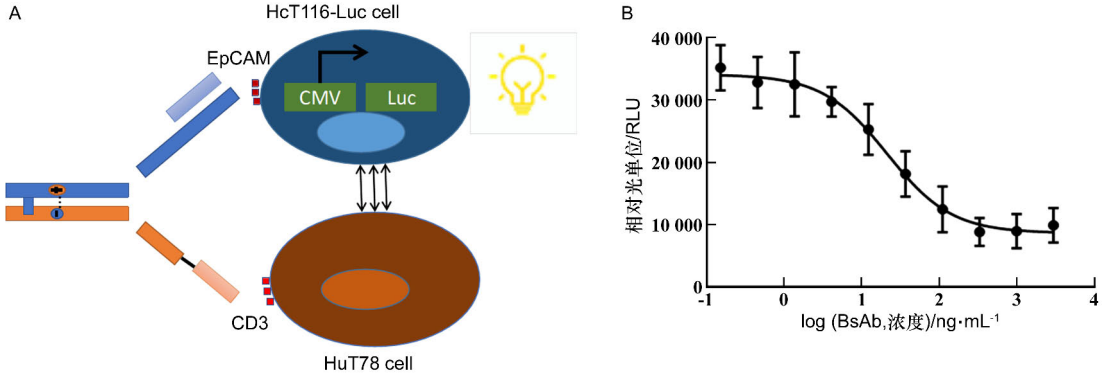
抗 EpCAM + CD3 BsAb(本实验室留样);pGL4.51[Luc2/CMV/Neo]质粒(Progema 公司,货号:E1320);DH 5α 感受态细胞(TransGen Biotech 公司,货号:CD201);Sal Ⅰ-HF(New England BioLabs 公司,货号:R3138S);Fluc-Uni 底物溶液试剂盒(北京锐金斯生物科技有限公司,货号:FU-1000T);DMEM 培养基(Gibco 公司,货号:C11995500BT)、RPMI 1640 培养基(Gbico 公司,货号:C11875500BT)、胎牛血清(Fetal Bovine Serum,FBS;Gibco 公司,货号:16000-044)、遗传霉素(G_{418},Gibco 公司,货号:10131-027)、Lipofectamine 2000(Gibco 公司,货号:11668-019)、Opti-MEM™培养基(Gibco 公司,货号:11058-021);牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA,Sigma 公司,货号:B2064);Mouse Anti-Human CD326(货号:565398)及其同型对照(BD 公司,货号:564416);96 孔细胞培养板(Corning 公司,货号:3599)、96 孔检测板(Corning 公司,货号:3917)。

3 仪器

SpectraMax i3x 多功能酶标仪及 SoftMax 7 软件(Molecular Devices 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(BD 公司)。

4 RGA 法测活原理

T 细胞招募型 BsAb 能同时特异性结合并拉近靶细胞和免疫效应细胞,产生导向性免疫效应,触发效应细胞对靶细胞的特异性杀伤。本研究选用 HcT116 细胞作为靶细胞,将 pGL4.51[Luc2/CMV/Neo]质粒转入 HcT116 细胞,加压筛选获得稳定高表达 Luc 单克隆细胞株。当适量抗 EpCAM + CD3 BsAb,HuT78 细胞和 HcT116 转基因细胞共同存在时,Luc 的整体表达水平与活 HcT116 转基因细胞数量呈正相关性,与抗 EpCAM + CD3 BsAb 呈现浓度依赖性(见图 1)。



A:细胞毒性作用检测的示意图; B:生物学活性检测中抗 EpCAM + CD3 BsAb 的剂量-反应曲线

图 1 抗 EpCAM + CD3 BsAb 介导的细胞毒作用

5 实验方法

5.1 靶细胞表面抗原检测 收集对数生长期 HcT116 细胞,预冷 1% BSA/PBS 重悬细胞,冰浴条件下,HcT116 细胞与抗体(抗 EpCAM/同型对照)避光孵育 30 min,1% BSA/PBS 洗涤细胞 3 遍并重悬,采用 FACSCalibur 流式细胞仪对标记细胞进行检测分析。

5.2 HcT116 细胞转染 收集对数生长期 HcT116 细胞,用生长培养基(含 10% FBS DMEM)稀释至 3×10^5 个·mL^{-1},以 1 mL·$孔^{-1}$接种 6 孔板 37 ℃,5% CO_2 培养 24 h;离心管 A 加入 90 μL pGL4.51[Luc2/CMV/Neo]质粒和 1.6 mL Opti-MEM™培养基,离心管 B 加入 16 μL Lipofectamine® 2000 reagent 和 1.6 mL Opti-MEM™培养基,室温孵育 5 min,混合管 A/B 液体并室温孵育 20 min;Opti-MEM™培养基清洗细胞;管 A/B 混合液以 0.8 mL·$孔^{-1}$滴加到 6 孔板,对照孔加入 0.8 mL·mL^{-1} Opti-MEM™,培养基培养 2 h 后,孔内培养基更换为 2 mL 生长培养基,继续培养 48 h 后,孔内培养基更换为 2 mL 加压培养基(含 10% FBS,500 ng·mL^{-1} G_{418} DMEM)加压筛选培养至转染孔细胞长满。

5.3 HcT116-Luc 细胞筛选构建 胰酶消化转染孔存活细胞,加压培养基以有限稀释法稀释细胞至 10 个·mL^{-1},0.1 mL·$孔^{-1}$接种 96 孔细胞培养板培

养至单克隆细胞形成,完成第 1 轮筛选。取 Luc 表达量高的单克隆细胞株进行第 2 轮筛选,获得高表达 Luc 的 HcT116-Luc 细胞,加压培养基培养建库。

5.4 抗 EpCAM + CD3 BsAb 生物学活性测定方法优化 检测培养基(含 2% FBS RPMI 1640)重悬对数期 HcT116-Luc 和 HuT78 细胞,按设定效靶比和细胞密度混合相应数量的效靶细胞,50 μL·孔$^{-1}$接种至 96 孔检测板。加入检测培养基系列稀释的抗 EpCAM + CD3 BsAb 50 μL·孔$^{-1}$,阴性对照孔加入 50 μL·孔$^{-1}$检测培养基。37 ℃,5% CO_2 孵育规定时间。孵育结束后,取出检测板室温平衡 30 min,以 100 μL·孔$^{-1}$加入 Fluc-Uni 底物溶液,室温避光显色 5 min,SpectraMax i3x 读取化学发光值(relative light unit,RLU)。

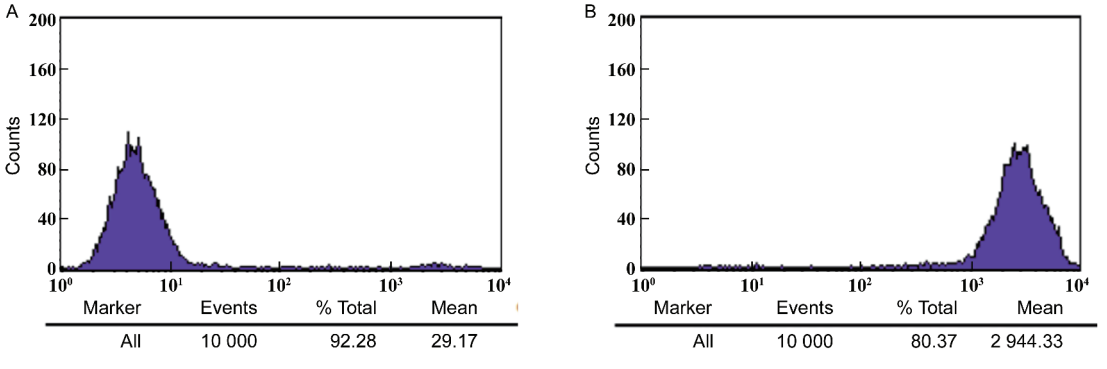
5.5 RGA 法测定抗 EpCAM + CD3 BsAb 生物学活性 检测培养基重悬对数期 HcT116-Luc 和 HuT78 细胞,调整细胞密度为 2.2×10^5 个·mL^{-1},HuT78 细胞和 HcT116-Luc 细胞以 10∶1效靶比混匀,以 50 μL·孔$^{-1}$接种至 96 孔检测板。抗 EpCAM + CD3 BsAb 以 3 000 ng·mL^{-1}起始 1∶3.5 向下稀释 9 个浓度梯度,共 10 个检测浓度,以 50 μL·孔$^{-1}$加入已接种细胞的检测板,阴性对照孔加入 50 μL·孔$^{-1}$检测培养基。检测板 37 ℃,5% CO_2 培养 72 h。孵育结束后,培养板室温平衡 30 min,加入 100 μL·孔$^{-1}$ Fluc-Uni 底物溶液,室温避光反应 5 min,SpectraMax i3x 读取 RLU 值。

5.6 数据分析 使用 GraphPad Prism 5 进行数据分析,计算样品孔与阴性对照孔 RLU 比值(RLU 比值 = 样品 RLU/阴性对照 RLU),以 RLU 比值为响应值,4 参数模式拟合剂量-反应曲线,拟合 4 参数方程为 $Y = D + (A - D)/(1 + (X/C)^{\wedge}B)$,其中的 C 值即为样品半数有效浓度(50% effective concentration,EC_{50}),A 值为上渐近线值,D 值为下渐近线值。进一步计算样品相对活性(样品相对活性 = 100% × 参比品 EC_{50}/样品 EC_{50})和信噪比(signal-to-noise ratio,S/N),S/N = 上渐近线值/下渐近线值。结果统计分析采用双侧 t 检验进行组间比较,$P < 0.05$ 为具有统计学显著性差异。

结 果

1 靶细胞表面抗原检测

与阴性对照组(见图 2A)相比,HcT116 细胞表面高水平表达 EpCAM(见图 2B),其平均荧光信号强度(mean fluorescene intensity,MFI)约为对照组的 101 倍。根据 FACS 检测结果,HcT116 细胞适宜作为本研究的靶细胞。

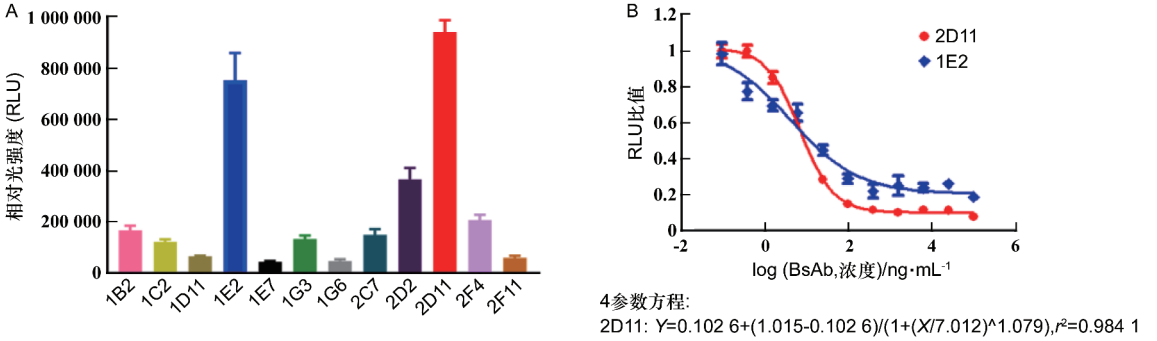


A:阴性对照细胞 EpCAM FACS 检测结果; B:HcT116 细胞 EpCAM FACS 检测结果

图 2 靶细胞表面抗原检测结果

2 HcT116-Luc 构建

pGL4. 51[Luc2/CMV/Neo]质粒稳定转染 HcT116 细胞后,经 2 次有限稀释筛选共获得 12 株高表达 Luc 细胞株,其中 1E2 株和 2D11 株 Luc 表达水平最高(见图 3A)。使用 1E2 株和 2D11 株进行预试验,结果如图 3B 所示,1E2 株和 2D11 株量效曲线均呈 S 型四参数曲线,相关系数(r^2)值分别为 0.872 5 和 0.984 1,其中 2D11 株 S/N 值高于 1E2 株(9.90 vs 4.96),且 2D11 株本底(下渐近线)值低于 1E2 株(0.102 6 vs 0.206 4)。基于上述结果,选择 2D11 株命名为 HcT116-Luc 细胞,作为 RGA 法检测用靶细胞。



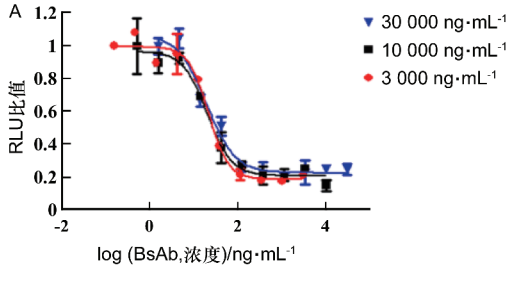
4参数方程:
2D11: Y=0.102 6+(1.015-0.102 6)/(1+(X/7.012)^1.079),r^2=0.984 1
1E2: Y=0.206 4+(1.023-0.206 4)/(1+(X/40 279)^0.538 4),r^2=0.872 5

A:12 株单克隆细胞株 Luc 表达水平比较;B:1E2 株和 2D11 株预试验结果

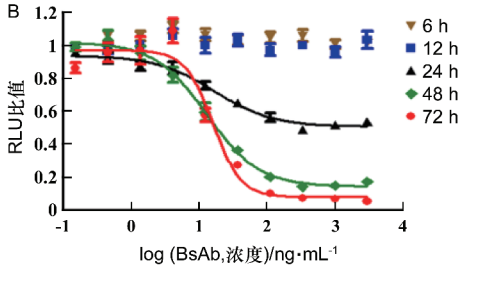
图 3 HcT116-Luc 细胞系构建结果

3 检测条件优化

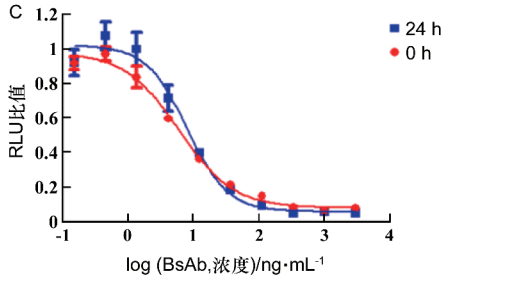
3.1 样品起始浓度优化 按照"**5.4**"项检测:样品起始浓度分别为 30 000,10 000 和 3 000 ng·mL^{-1},向下 1∶3 系列稀释 9 个浓度梯度,共 10 个检测浓度;细胞密度 5.5×10^5 个·mL^{-1},效靶比 3∶1;37 ℃,5% CO_2 孵育 72 h(结果见图 4A)。3 个起始浓度样品所得量效曲线均呈 S 型 4 参数曲线,r^2 分别为 0.955 6,0.945 4 和 0.974 3,S/N 分别为 4.72,4.60 和 5.30,说明 3 个不同起始浓度经 1∶3 系列稀释后均可获得完整的剂量-反应曲线。其中 3 000 ng·mL^{-1}起始浓度 S/N 最大,上下平台浓度点和线性段浓度点合理,根据该结果选择 3 000 ng·mL^{-1}作为样品稀释起始浓度。



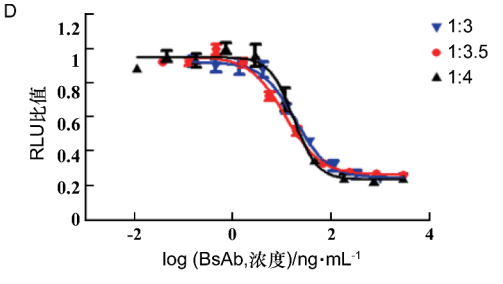
4参数方程:
30 000 ng·mL^{-1}: Y=0.226 5+(1.068-0.226 5)/(1+(X/19.12)^1.335),r^2=0.955 6
10 000 ng·mL^{-1}: Y=0.209 4+(0.963 7-0.209 4)/(1+(X/19.95)^1.590),r^2=0.945 4
3 000 ng·mL^{-1}: Y=0.187 1+(0.992 1-0.187 1)/(1+(X/21.38)^1.929),r^2=0.974 3



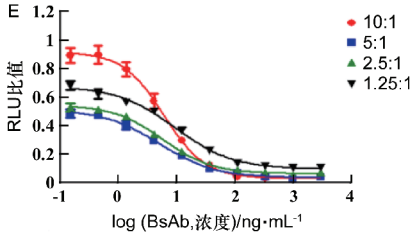
4参数方程:
24 h: Y=0.505 0+(0.937 3-0.505 0)/(1+(X/16.78)^1.005),r^2=0.892 5
48 h: Y=0.142 0+(1.017-0.142 0)/(1+(X/13.03)^1.131),r^2=0.952 4
72 h: Y=0.078 82+(0.969 4-0.078 22)/(1+(X/16.09)^2.117),r^2=0.918 8

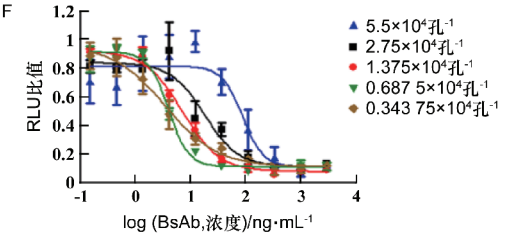


4参数方程:
24 h: Y=0.060 06+(1.021-0.060 06)/(1+(X/8.027)^1.403),r^2=0.912 3
0 h: Y=0.080 94+(0.981 3-0.080 94)/(1+(X/6.025)^1.044),r^2=0.961 4



4参数方程:
1:3: Y=0.247 5+(0.920 9-0.247 5)/(1+(X/18.78)^1.309),r^2=0.941 8
1:3.5: Y=0.264 4+(0.951 5-0.264 4)/(1+(X/11 78)^1.217),r^2=0.962 0
1:4: Y=0.237 4+(0.949 3-0.237 4)/(1+(X/17 34)^1.837),r^2=0.931 9





4参数方程:
10:1: $Y=0.032\ 56+(0.914\ 7-0.032\ 56)/(1+(X/6.146)^{1.244})$,$r^2=0.952\ 4$
5:1: $Y=0.036\ 70+(0.511\ 0-0.036\ 70)/(1+(X/5.238)^{0.915\ 1})$,$r^2=0.961\ 0$
2.5:1: $Y=0.064\ 87+(0.543\ 4-0.064\ 87)/(1+(X/5.937)^{1.034})$,$r^2=0.968\ 0$
1.25:1: $Y=0.096\ 25+(0.675\ 7-0.096\ 25)/(1+(X/9.624)^{0.875\ 3})$,$r^2=0.955\ 6$

4参数方程:
5.5×10^4孔$^{-1}$: $Y=0.111\ 3+(0.812\ 9-0.111\ 3)/(1+(X/89.16)^{2.310})$,$r^2=0.732\ 6$
2.75×10^4孔$^{-1}$: $Y=0.114\ 4+(0.836\ 8-0.114\ 4)/(1+(X/18\ 07)^{1.425})$,$r^2=0.839\ 4$
1.375×10^4孔$^{-1}$: $Y=0.078\ 04+(0.920\ 4-0.078\ 04)/(1+(X/7\ 181)^{1.281})$,$r^2=0.975\ 4$
$0.687\ 5\times10^4$孔$^{-1}$: $Y=0.111\ 8+(0.913\ 1-0.111\ 8)/(1+(X/4\ 045)^{2.401})$,$r^2=0.968\ 3$
$0.343\ 75\times10^4$孔$^{-1}$: $Y=0.110\ 1+(0.959\ 7\ 1-0.110\ 1)/(1+(X/3\ 575)^{0.908\ 9})$,$r^2=0.892\ 8$

A:起始浓度优化结果;B:孵育时间优化结果;C:效靶细胞接种时间优化结果;D:稀释比例优化结果;
E:效靶比优化结果;F:效靶细胞接种密度优化结果

图 4 RGA 方法的建立和优化

3.2 孵育时间优化 按照"**5.4**"项检测,样品以 3 000 ng·mL^{-1}起始 1∶3向下稀释 9 个浓度梯度,共 10 个检测浓度;细胞密度 5.5×10^5 个·mL^{-1},效靶比 3∶1;37 ℃,5% CO_2 分别孵育 6,12,24,48 和 72 h。结果如图 4B 所示,孵育 6 和 12 h 条件下,靶细胞无杀伤;孵育 24,48 和 72 h 的量效曲线均呈 S 型 4 参数曲线,*S/N* 分别为 1.86,7.16 和 12.39,根据该结果,选择 *S/N* 值最大的 72 h 作为孵育时间。

3.3 效靶细胞接种时间优化 按结果"**3.2**"项优化参数检测,效靶细胞接种时间分别为细胞接种 24 h 后加样(24 h)和细胞接种后立即加样(0 h);加样后孵育时间为 72 h。结果如图 4C 所示,24 和 0 h 量效曲线均呈 S 型 4 参数曲线,r^2 分别为 0.912 3 和 0.961 4,*S/N* 分别为 17.01 和 12.10。考虑试验操作简便性,在 *S/N* 值均 >10 的情况下,选择细胞接种后立即加样(0 h)作为效靶细胞接种时间。

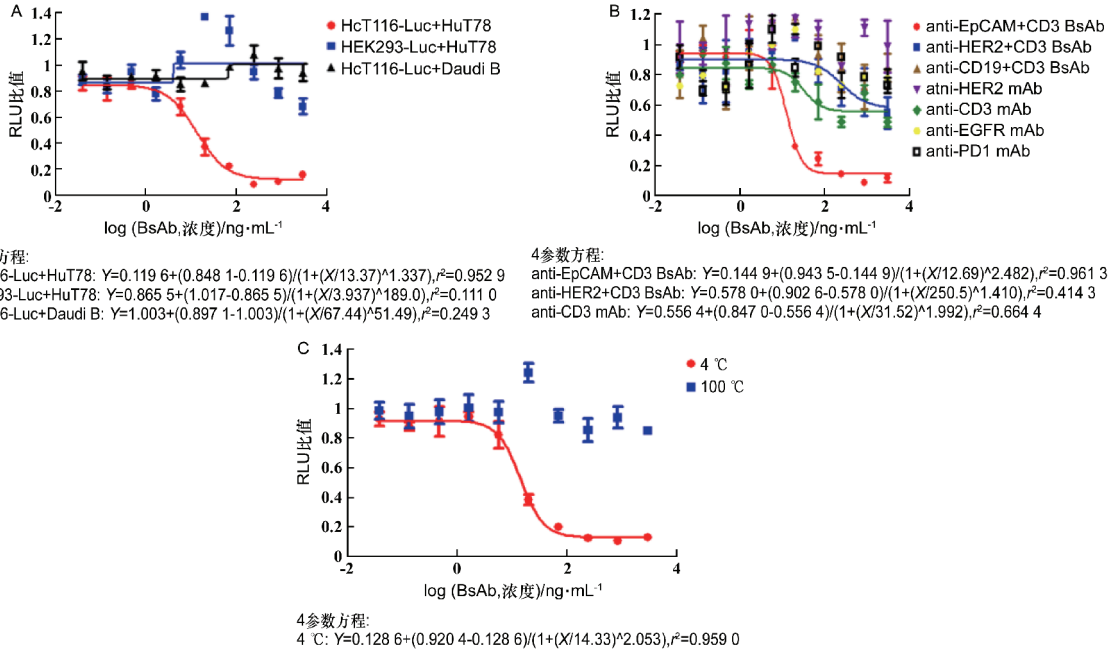
3.4 稀释比例优化 按结果"**3.3**"项优化参数检测,样品以 3 000·mL^{-1}为起始浓度,分别以稀释比例 1∶3,1∶3.5 和 1∶4系列稀释 9 个浓度梯度,共 10 个检测浓度。结果如图 4D 所示,量效曲线均呈 S 型 4 参数曲线,r^2 分别为 0.941 8,0.962 0 和 0.931 9,*S/N* 分别为 3.72,3.60 和 4.01。比较 3 个稀释比例曲线,1∶3.5 组曲线浓度点分布均匀,曲线上下平台、拐点和线性段定位点数量和位置较 1∶3和 1∶4 组更合理,根据上述结果,选择 1∶3.5 作为稀释比例。

3.5 效靶比优化 按结果"**3.4**"优化参数检测,固定 HcT116-Luc 细胞 2.5×10^3 个·孔$^{-1}$,按照 10∶1,5∶1,2.5∶1和 1.25∶1效靶比混合效靶细胞进行检测。结果如图 4E 所示,所有效靶比 4 参数曲线 r^2 均 >0.95,效靶比 10∶1时,其 *S/N* 最大。根据以上结果,选择检测试验效靶比为 10∶1。

3.6 效靶细胞接种密度优化 按结果"**3.5**"项优化参数检测,效靶比固定为 10∶1,效靶细胞混合悬液接种数量分别为 5.5×10^4,2.75×10^4,1.375×10^4,0.687 5×10^4 和 0.343 75×10^4 个·孔$^{-1}$。结果如图 4F 所示,各组相关系数 r^2 分别为 0.743 6,0.897 4,0.975 4,0.968 3 和 0.892 8,*S/N* 分别为 7.30,7.31,11.79,8.17 和 8.72,效靶细胞接种密度 1.375×10^4 和 0.687 5×10^4 个·孔$^{-1}$时剂量-效应曲线完整,相关系数较好,*S/N* 较高,且与其他组存在显著性差异($P<0.05$)。综合评估试验的稳定性和易操作性,效靶细胞接种密度确定为 1.1×10^4 个·孔$^{-1}$。

4 RGA 方法学验证

4.1 特异性 特异性验证包括细胞特异性验证和样品特异性验证。细胞特异性验证中,使用稳定表达 Luc 基因的 HEK293-Luc 细胞替代 HcT116-Luc 细胞作为靶细胞,使用 Daudi B 细胞替代 HuT78 细胞作为效应细胞,分别进行靶细胞和效应细胞的特异性验证。结果如图 5A 所示,效靶细胞替代后无量效相关性,说明只有特异性效靶细胞同时存在,BsAb 才能介导效应细胞对靶细胞的特异性杀伤[13]。



A:效靶细胞特异性验证结果;B:相关样品特异性验证结果;C:强制降解样品特异性验证结果

图 5 特异性验证结果

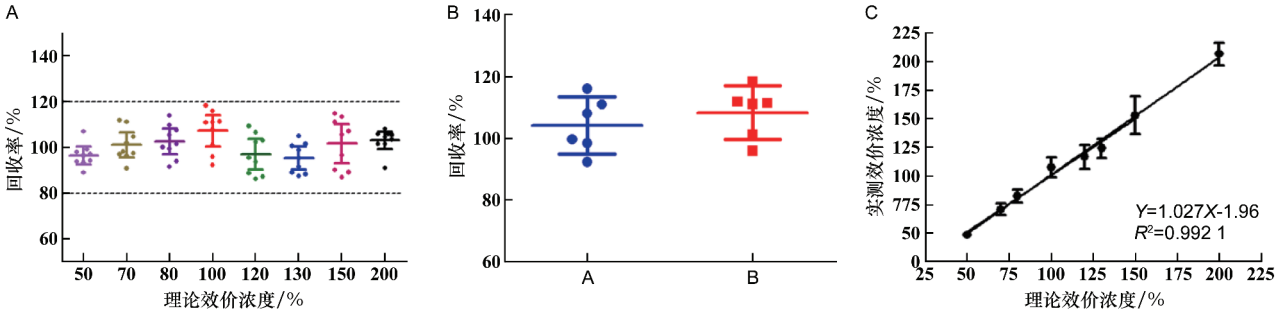
样品特异性检测中对 6 个相关样品和 1 个抗 EpCAM + CD3 BsAb 的强制降解样品进行检测。相关样品检测中(见图 5B),抗 CD19 + CD3 BsAb、曲妥珠单抗(anti-HER2 monoclonal antibody, anti-HER2 mAb)、西妥昔单抗(anti-EGFR mAb)和帕博利珠单抗(anti-PD1 mAb)均未呈现明显的量效曲线;抗 HER2 + CD3 BsAb(anti-HER2 + CD3 BsAb)和抗 CD3 单抗(anti-CD3 mAb)曲线呈现一定量效相关性,但曲线拟合度差(r^2 均 <0.39),与抗 EpCAM + CD3 BsAb 比较,其 S/N 值存在明显的显著性差异(P <0.001),推测可能是抗 CD3 端结合并激活 T 细胞后产生的非特异性杀伤[14-15],此类样品对方法特异性的干扰可通过在检测中设定 r^2 值和 S/N 值的系统适用性标准予以排除。强制降解样品检测中(见图 5C),100 ℃处理 6 h 样品与未处理样品(4 ℃保存)相比,强制降解样品不能介导 HuT78 细胞杀伤 HcT116-Luc 细胞,无量效曲线。

特异性验证结果证明,结合适当的系统适用性标准条件下,建立方法的特异性可满足质控应用要求。

4.2 精密度、准确性和线性 精密度和准确性验证中,使用 100% 起始浓度(3 000 ng·mL^{-1})作为参考浓度,制备参考浓度的 50%,70%,80%,100%,120%,130%,150% 和 200% 效价浓度,共计 8 个效价浓度样品,每个样品每天检测 3 个平行样,连续测定 3 d,结果见表 1 和图 6A。各浓度回收率为 95.48% ~ 107.37%,均在理论效价浓度 ±15% 范围内,日间变异系数%(coefficient of variation, CV%)为 4.80% ~ 9.97%(<10%)。以上结果表明建立的 RGA 法具有良好的精密度和准确性。

表 1 RGA 法的准确性和精密度验证结果

效价浓度	相对生物学活性/%				回收率/%			
/%	均值	SD	日间 CV%	95% CI	均值	SD	日间 CV%	95% CI
50	48.31	2.48	5.14	46.40 ~ 50.22	96.61	4.96	5.14	92.79 ~ 100.40
70	70.85	4.94	6.97	67.05 ~ 74.64	101.21	7.05	6.97	95.79 ~ 106.60
80	82.19	5.83	7.10	77.70 ~ 86.67	102.73	7.29	7.10	97.13 ~ 108.30
100	107.37	8.92	8.30	100.50 ~ 114.20	107.37	8.92	8.30	100.50 ~ 114.20
120	116.55	10.40	8.92	108.60 ~ 124.50	97.12	8.66	8.92	90.46 ~ 103.80
130	124.12	8.41	6.78	117.70 ~ 130.60	95.48	6.47	6.78	90.51 ~ 100.50
150	153.74	15.32	9.97	142.00 ~ 165.50	102.50	10.21	9.97	94.64 ~ 110.30
200	206.39	9.92	4.80	198.80 ~ 214.00	103.19	4.96	4.80	99.38 ~ 107.00



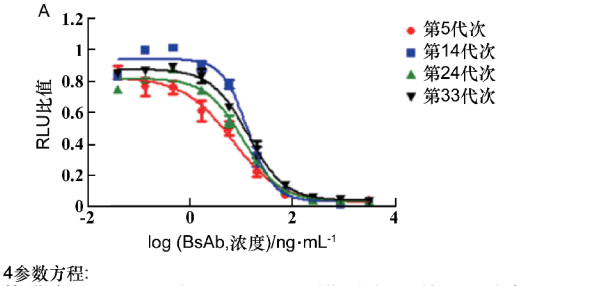
A:不同效价浓度的检测结果(95% CI);B:中间精密度验证结果;C:线性验证结果

图 6 准确性和精密度验证结果($\bar{x} \pm s$)

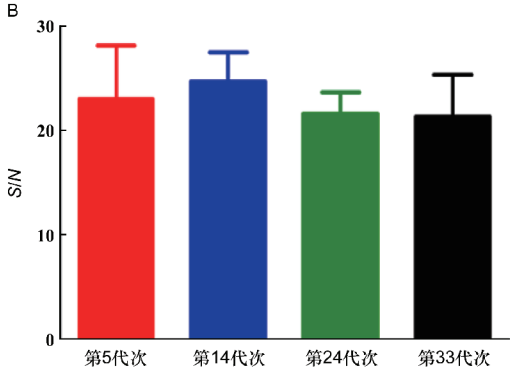
中间精密度验证中,2 位试验人员 A 和 B 不同时间对 100% 效价浓度进行 6 次有效测定,平均相对生物学活性分别为 104.33% 和 108.45%,其 95% 置信区间(confidence interval,CI)分别为 95.01% ~ 113.70% 和 99.84% ~ 117.10%,回收率在 80% ~ 120% 范围内,2 位检测结果经双侧 t 检验不具有显著性差异(P = 0.424 3,见图 6B)。上述结果证明建立的 RGA 方法具有良好的中间精密度。

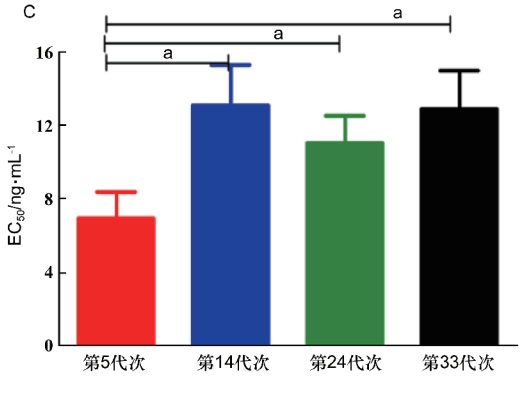
线性验证中,将 8 个效价浓度的检测相对生物学活性值与理论生物学活性值进行线性回归分析(见图 6C)。可见测得的生物学活性与预期生物学活性显示良好的线性关系 $Y = 1.027X - 1.96$,$r^2 > 0.99$,说明建立的 RGA 法具有较好的线性。

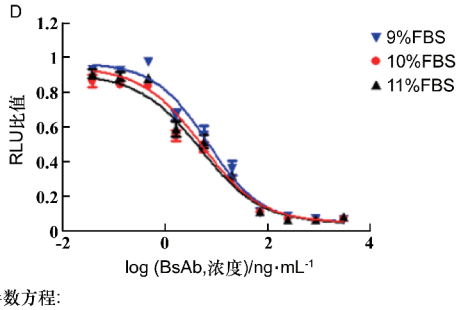
4.3 代次稳定性 连续培养 HcT116-Luc 细胞至 33 代(细胞每消化传代 1 次为"一代"),取 4 个代次(5,14,24,33)细胞进行活性检测。4 个代次的量效曲线均呈现典型 S 型 4 参数曲线(见图 7A),r^2 分别为 0.965 4,0.979 4,0.985 5 和 0.988 5,S/N 值分别为 28.07,25.44,21.79 和 21.55,双侧 t 检验分析 4 个代次 S/N 间不具有显著性差异($P > 0.05$,见图 7B),但第 14,24 和 33 共 3 个代次量效曲线的 EC_{50} 显著高于第 5 代次曲线的 EC_{50}($P < 0.01$,见图 7C),推测在 14 代次以后,靶细胞的基因组才稳定。根据上述结果,确定适用于检测的 HcT116-Luc 细胞代次为第 14 ~ 33 代次。



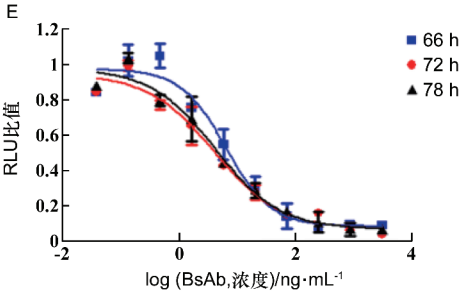
4参数方程:
第5代次: Y=0.029 35+(0.824 0-0.029 35)/(1+(X/6.582)^0.918 6),r²=0.965 4
第14代次: Y=0.037 12+(0.944 4-0.037 12)/(1+(X/13.28)^1.748),r²=0.979 4
第24代次: Y=0.037 57+(0.818 8-0.037 57)/(1+(X/10.72)^1.218),r²=0.985 5
第33代次: Y=0.040 77+(0.878 4-0.040 77)/(1+(X/13.39)^1.215),r²=0.988 5

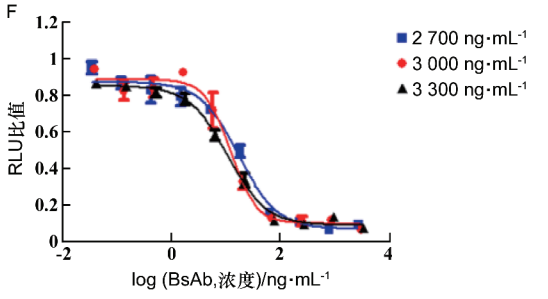






4参数方程:
9%FBS: Y=0.050 51+(0.970 3-0.050 51)/(1+(X/6.759)^0.837 0),r²=0.978 5
10%FBS: Y=0.043 18+(0.906 8-0.043 18)/(1+(X/4.844)^0.729 1),r²=0.980 1
11%FBS: Y=0.046 86+(0.946 2-0.046 86)/(1+(X/5.189)^0.751 0),r²=0.979 6





4参数方程:
66 h: $Y=0.085\ 56+(0.975\ 0-0.085\ 56)/(1+(X/6.363)^{1.121})$, $r^2=0.952\ 7$
72 h: $Y=0.068\ 35+(0.947\ 1-0.068\ 35)/(1+(X/4.010)^{0.762\ 6})$, $r^2=0.965\ 4$
78 h: $Y=0.069\ 01+(0.978\ 0-0.069\ 01)/(1+(X/4.184)^{0.785\ 9})$, $r^2=0.962\ 2$

4参数方程:
2 700 ng·mL^{-1}: $Y=0.071\ 32+(0.873\ 2-0.071\ 32)/(1+(X/17.22)^{1.233})$, $r^2=0.980\ 3$
3 000 ng·mL^{-1}: $Y=0.101\ 5+(0.885\ 9-0.101\ 5)/(1+(X/12.24)^{1.848})$, $r^2=0.974\ 8$
3 300 ng·mL^{-1}: $Y=0.091\ 94+(0.852\ 1-0.091\ 94)/(1+(X/10.73)^{1.228})$, $r^2=0.992\ 2$

A:4 个代次 HcT116-Luc 细胞的量效反应曲线;B:4 个代次 HcT116-Luc 细胞量效曲线的 *S/N* 值;C:4 个代次 HcT116-Luc 细胞量效曲线的 EC_{50};D:FBS 浓度变化对检测结果的影响;E:孵育时间变化对检测结果的影响;F:起始浓度变化对检测结果的影响; a:$P<0.01$

图 7 细胞的代次稳定性和耐用性验证结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

4.4 耐用性 耐用性验证包括 3 个验证内容,分别为培养基胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)浓度变化、孵育时间变化和起始浓度变化,变化幅度为 ±10%,耐用性验证检测结果见图 7。培养基 FBS 浓度变化和孵育时间变化前后 r^2 均 >0.95(见图 7D 和 7E),经双侧 *t* 检验分析变化前后各组 *S/N* 间、EC_{50}间不具有显著性差异($P>0.05$)。起始浓度 2 700,3 000 和 3 300 ng·mL^{-1}量效曲线的 r^2 分别为 0.980 3,0.974 8 和 0.992 2(见图 7F),*S/N* 值分别为 12.24,8.73 和 9.27,经双侧 *t* 检验分析,各起始浓度组 EC_{50}间不具有显著性差异($P>0.05$),但起始浓度 2 700 ng·mL^{-1}量效曲线 *S/N* 与 3 000 和 3 300 ng·mL^{-1}曲线 *S/N* 间有显著性差异($P<0.05$),推测与起始浓度降低导致的曲线位移有关。但各组 *S/N* 均 >5,满足应用要求。由上述结果可知,建立的 RGA 法具有良好的耐用性。

讨 论

基于报告基因 RGA 的生物学活性测定已被用于多种抗体药物的生物学活性质控[12,16-19]。RGA 法具有简单、快捷、灵敏、稳定的特点,传统的测定抗体药物生物学活性 RGA 法的关键在于:可与抗体药物结合的配体、模拟药物作用机制的细胞内信号传导过程和受上述信号调节的报告基因表达 3 个方面。本研究中,为测定 T 细胞招募型 BsAb 的肿瘤杀伤效果,通过将 Luc 报告基因稳定转染 HcT116 细胞,直接利用报告基因的表达量表征靶细胞的存活,并未涉及传统 RGA 法的 3 个关键技术内容,为报告基因法测定抗体药物,特别是 BsAb 产品的生物学活性提供了新思路。

本研究将 Luc 报告基因稳定转染 HcT116 细胞,成功建立并优化了基于传代细胞的抗 EpCAM + CD3 BsAb 生物学活性测定的 RGA 法,所建立方法较传统的 PBMC 杀伤靶细胞法具有操作简单、准确性高的优势。方法学验证结果表明,所建立方法的特异性、准确性、精密度、线性、代次稳定性和耐用性均符合抗 EpCAM + CD3 BsAb 质量控制的应用要求。

[参 考 文 献]

[1] ZHANG F, WANG KQ, WAGN L. Development in bispecific antibody[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(1): 78-85.

[2] SEDYKH SE, PRINZ VV, BUNEVA VN, *et al*. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives[J]. *Drug Des Dev Ther*, 2018, 12: 195-208.

[3] LABRIJN AF, JANMAAT ML, REICHERT JM, *et al*. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(8): 585.

[4] TRABOLSI A, ARUMOV A, SCHATZ JH. T cell-activating bispecific antibodies in cancer therapy[J]. *J Immunol*, 2019, 203(3): 585-592.

[5] YU L, WANG JH. T cell-redirecting bispecific antibodies in cancer immunotherapy: recent advances[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(4): 941-956.

[6] WU Z, CHEUNG NV. T cell engaging bispecific antibody (T-BsAb): from technology to therapeutics[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 182: 161-175.

[7] VELASQUEZ MP, BONIFANT CL, GOTTSCHALK S. Redirecting T cells to hematological malignancies with bispecific antibodies[J]. *Blood*, 2018, 131(1): 30-38.

[8] THAKUR A, HUANG M, LUM LG. Bispecific antibody based therapeutics: strengths and challenges[J]. *Blood Rev*, 2018, 32(4): 339-347.

[9] STROHL N. Bispecific T-cell redirection versus chimeric antigen receptor (CAR)-T cells as approaches to kill cancer cells[J]. *Antibodies*, 2019, 8(3): 41.

[10] BOKEMEYER C. Catumaxomab-trifunctional anti-EpCAM antibody used to treat malignant ascites[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(8): 1259 – 1269.
[11] YU SN, ZHANG J, YAN YX, *et al*. A novel asymmetrical anti-HER2/CD3 bispecific antibody exhibits potent cytotoxicity for HER2-positive tumor cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 355.
[12] CHENG ZJ, GARVIN D, PAGUIO A, *et al*. Development of a robust reporter-based ADCC assay with frozen, thaw-and-use cells to measure Fc effector function of therapeutic antibodies[J]. *J Immunol Methods*, 2014, 414: 69 – 81.
[13] LEE HY, REGISTER A, SHIM J, *et al*. Characterization of a single reporter-gene potency assay for T-cell-dependent bispecific molecules[J]. *mAbs*, 2019, 11(7): 1245 – 1253.
[14] ANDERSON PM, BLAZAR BR, BACH FH, *et al*. Anti-CD3 + IL-2-stimulated murine killer cells. *In vitro* generation and *in vivo* antitumor activity[J]. *J Immunol*, 1989, 142(4): 1383 – 1394.
[15] SCHWAB R, CROW MK, RUSSO C, *et al*. Requirements for T cell activation by OKT3 monoclonal antibody: role of modulation of T3 molecules and interleukin 1[J]. *J Immunol*, 1985, 135(3): 1714 – 1718.
[16] WANG L, YU CF, WANG JZ. Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuticals[J]. *Biotechnol Adv*, 2020, 39: 107466.
[17] WANG L, YU CF, YANG YL, *et al*. Development of a robust reporter gene assay to measure the bioactivity of anti-PD-1/anti-PD-L1 therapeutic antibodies[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 145: 447 – 453.
[18] YU CF, CAO JX, WANG L, *et al*. Measuring the bioactivity of anti-IL-6/anti-IL-6R therapeutic antibodies: presentation of a robust reporter gene assay[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(27): 7067 – 7075.
[19] GUO S, YU CF, WANG YC, *et al*. A robust and stable reporter gene bioassay for anti-IgE antibodies[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(8): 1901 – 1914.

编辑:赵文锐/接受日期:2020 – 05 – 27