

利用表面等离子体共振技术检测重组抗体 NM57 免疫原性

常 亮^{1,2†}, 刘晓志^{1,2†}, 赵 伟^{1,2}, 刘艳玲^{1,2}, 董向峰^{1,2}, 陈雪静^{1,2},
李立敏^{1,2}, 蒋 艳^{1,2}, 高 健^{1,2*}, 魏敬双^{1,2*}

(华北制药集团 1. 新药研究开发有限责任公司, 2. 抗体药物研制国家重点实验室, 河北 石家庄 050015)

摘要: 随着生物技术药物的大量研发, 药物免疫原性评价成为阐明药物临床安全性和有效性的关键因素, 建立稳定可靠的评价体系成为了研究热点。由于具有实时、连续监测等优势, 表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 技术已被广泛用于生物药物免疫原性的评价。本研究应用该技术对重组抗狂犬病毒人源单克隆抗体 NM57 期临床实验阶段接受注射的 48 名志愿者进行抗药物抗体 (anti-drug antibody, ADA) 检测。结果表明, 该检测方法可达到抗体药物免疫原性检测的基本要求。

关键词: 免疫原性; 表面等离子体共振; 重组狂犬病毒人源单克隆抗体

中图分类号: R392

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2013) 04-0532-04

Testing immunogenicity of recombinant antibody by surface plasmon resonance

CHANG Liang^{1,2†}, LIU Xiao-zhi^{1,2†}, ZHAO Wei^{1,2}, LIU Yan-ling^{1,2}, DONG Xiang-feng^{1,2},
CHEN Xue-jing^{1,2}, LI Li-min^{1,2}, JIANG Yan^{1,2}, GAO Jian^{1,2*}, WEI Jing-shuang^{1,2*}

(1. New Drug Research and Development Company Limited, 2. State Key Laboratory of Antibody Drug Development, North China Pharmaceutical Corporation, Shijiazhuang 050015, China)

Abstract: With the development of bio-technological drugs, drug immunogenicity evaluation has become key factor of clarifying safety and efficacy of these drugs. It has become the focus to establish a stable and reliable evaluation system. Due to the advantages such as continuous real-time monitoring, surface plasmon resonance (SPR) technology has been widely used in bio-technological drugs immunogenicity assessments. Our study applied this technology to detect anti-drug antibody (ADA) of a recombinant human anti-rabies monoclonal antibody NM57 in the sera of 48 volunteers admitted in phase I clinical trials. This method could satisfy the basic requirements of detection of ADA.

Key words: immunogenicity; surface plasmon resonance; recombinant human anti-rabies monoclonal antibody

免疫原性检测是生物技术药物临床安全性评价的重要组成部分, 药物引起的免疫反应对药物的动

力学、药效以及安全性具有重要影响, 轻则导致治疗无效, 重则可能影响患者健康^[1]。因此, 建立灵敏、准确的免疫原性检测方法是药物研发中的重要环节, 目前常用的检测方法有 ELISA、放射免疫沉淀法和表面等离子体共振 (SPR) 技术等^[2-6]。狂犬病是由狂犬病毒所致的自然疫源性人畜共患急性传染病, 无特效的治疗方法, 发病后以对症综合治疗为主, 目前临床中联合使用抗狂犬免疫球蛋白与疫苗进行狂犬病的

收稿日期: 2012-11-05; 修回日期: 2013-01-22.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2010CB735605, 2012CB724502); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2012AA020704, 2012AA02A302).

†同为第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-311-85993993, E-mail: gaojian1972@yahoo.com.cn

Tel: 86-311-85993043, E-mail: wjs3043@sina.com

暴露后预防。但是由于抗狂犬免疫球蛋白的使用存在相当未知风险, 因此重组人源抗狂犬病毒抗体被视为最有前景的替代品。我公司研制的抗狂犬病毒抗体 NM57 是一株针对狂犬病毒表面糖蛋白的全人单克隆抗体, 具有显著的病毒中和活性, 目前处于 I 期临床试验阶段。本研究应用 SPR 法检测 I 期临床志愿者血清中针对 NM57 的抗药物抗体以评估其免疫原性。

材料与方法

临床血液样品的收集 临床试验经医院伦理委员会批准, 受试者均签署知情同意书。将狂犬抗体 NM57-I 期临床试验阶段的 48 名志愿者依照受注射剂量分为高、中、低三个组, 每组 16 人, 每组随机选择 4 人注射安慰剂作为对照。每个志愿者分别在注射前 (标记为 0 d) 及注射后 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 42, 56, 70 和 84 d 共 15 个时间点进行血液样品的采集。静置, 离心后取血清, 冻存于 -80°C 备用。

氨基偶联法标记 NM57 依照偶联试剂盒说明书, 将 *N*-乙基-*N'*-(二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) 和 *N*-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 按一定的比例加水分别溶解; CM5 传感片插入仪器后, 控制流速为 $5\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 用 HBS 缓冲液平衡体系, 待基线稳定, 开始标记 NM57:

EDC 和 NHS 各 $100\ \mu\text{L}$ 混合均匀, 注射混合液 $50\ \mu\text{L}$ 使其流过待标记通道, 活化传感片表面的羧基;

注射 $3.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NM57 溶液 (溶于 $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠缓冲液, pH 4.5), 将 NM57 通过氨基偶联标记于芯片表面, 标记目标 8000RU ; 注射乙醇胺的盐酸溶液 $35\ \mu\text{L}$ 封闭残余的活化羧基; 注射甘氨酸缓冲液 $10\ \mu\text{L}$ 洗去非键合的吸附蛋白和乙醇胺。

NM57 药物抗抗体 SPR 检测法的建立

鼠抗 NM57 单克隆抗体与 NM57 结合常数的测定 用 HBS 缓冲液梯度稀释鼠抗 NM57 单抗 (284 、 142 、 71 、 35.5 、 17.75 、 8.9 、 4.45 和 $2.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 离心 ($12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $10\ \text{min}$) 后检测。上样 $30\ \text{s}$, HBS 缓冲液平衡 $4\ \text{min}$, 甘氨酸缓冲液再生 $30\ \text{s}$, 流速 $30\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, HBS 缓冲液平衡 $3\ \text{min}$ 。

方法精密度和检测限度的确定 将人血清用 HBS 缓冲液稀释 5 倍作为阴性血清对照品, 将鼠抗 NM57 单克隆抗体稀释于上述阴性血清对照作为阳性血清对照品 ($1\ 000$ 、 500 、 250 、 125 、 62.5 、 31.2 、 15.6 、 $7.8\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 0), 离心 ($12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $10\ \text{min}$) 后检测, 每一个稀释度重复检测 3 次。

方法耐用性的确定 选择含 $62.5\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 鼠抗

NM57 抗体的阳性对照品, 用该阳性样品溶液配置不同浓度的 NM57 ($1\ 000$ 、 500 、 250 、 125 和 $62.5\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 溶液。上机检测上述各溶液的响应值以确定血清中 NM57 药物浓度对样品判定结果的影响程度。

临床血清样品 NM57 药物抗抗体检测 将 48 名志愿者的 720 个采血点血清样品同样用 HBS 缓冲液稀释 5 倍, 离心 ($12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $10\ \text{min}$), 依上述方法进行检测。以 48 名志愿者注射前 (0 d) 血清样品的检测平均值 $+3\times\text{SD}$ 作为阈值 (CutOff), 高于该值的样品判定为阳性^[7, 8]。

结果

1 NM57 的标记及其与鼠单亲亲和常数的测定

参照实验方法将抗体 NM57 标记于芯片通道 2、4 作为检测通道 (通道 1、3 为参比通道)。整个标记过程如图 1 所示: 活化芯片; 偶联抗体; 封闭芯片。

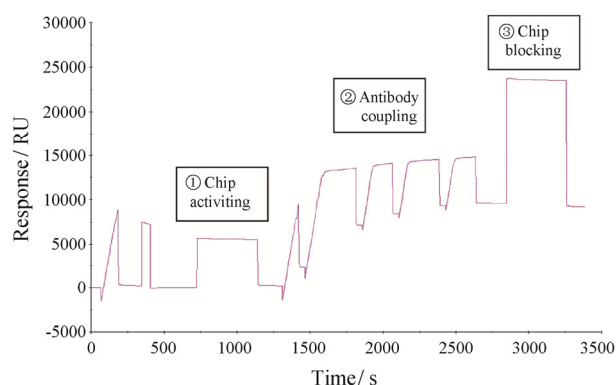


Figure 1 Sensorgram of antibody coupling

实验获得了梯度稀释的鼠抗 NM57 抗体与芯片表面标记的 NM57 的结合曲线, 通过 BIAeval 3.0 软件拟合一系列结合曲线 (图 2), 计算出抗 NM57 鼠单抗与 NM57 的结合常数为 $4\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2 NM57 药物抗抗体 SPR 检测法的建立

为了确定 SPR 检测的精密度和检测限度, 计算了每一稀释度重复测定 3 次 (图 3) 的均值、SD 及 RSD 值。经分析 (表 1), 各稀释度检测值的 RSD 值均小于 20%, 精密度符合检测要求。检测限度是指高于检测阈值的被测样品的最低量, 本实验中选择对应高出空白样品测定值 3 个标准差的值作为检测阈值, 即: $\text{CutOff} = 17.7 + 3 \times 2.7 = 25.8$, 对应选定的阳性样品最低浓度为 $31.2\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 故该方法的检测限度为 $31.2\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

由于血液中 NM57 药物浓度会对抗药物抗体的

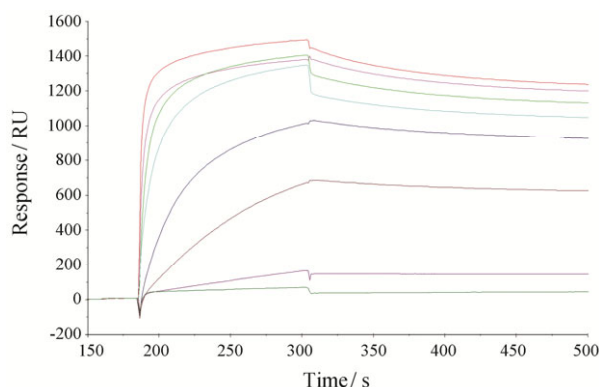


Figure 2 Binding curves of different concentrations of anti-NM57 mouse antibodies

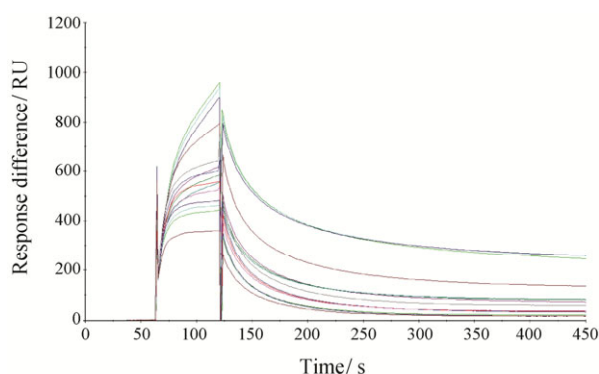


Figure 3 Binding curves of negative sera with different concentrations of anti-NM57 mouse antibody

Table 1 Results of negative sera with different concentrations of anti-NM57 mouse antibody

NM57/ng·mL ⁻¹	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
1 000	256.9 ± 6.7	2.6
500	135.8 ± 1.3	1
250	79.9 ± 2.6	3.3
125	51.7 ± 0.6	1.2
62.5	36.8 ± 1.7	4.7
31.2	25.9 ± 4.4	17
15.6	21.7 ± 4.1	18.9
7.8	20.7 ± 3.3	15.9
0	17.7 ± 2.7	15.4

检测产生干扰^[9], 因此需要确定 NM57 的血药浓度对该方法的影响程度。表 2 为含有不同浓度 NM57 的阳性样品检测结果, 结果显示, 随着样品中 NM57 浓度的增大, 阳性样品的响应值逐渐降低: 当 NM57 浓度达到 500 ng·mL⁻¹ 时, 其响应值 (26.0) 仍大于判定阈值 (25.8); 而浓度为 1 000 ng·mL⁻¹ 时, 响应值 (19.3) 已低于判定阈值。故 NM57 血药浓度不超过 500 ng·mL⁻¹ 时不会对判定结果产生影响, 而 I 期临床试验数据显示其血药浓度一般不会超过 500 ng·mL⁻¹, 因此表明该方法用于临床样品的抗药抗体检测时, 对于样

Table 2 Results of positive sera with different concentrations of NM57

NM57/ng·mL ⁻¹	1 000	500	250	125	62.5	0
RU	19.3	26.0	26.4	27.6	28.3	36.8

品中的药物浓度具有良好的耐受性。

3 临床血清样品中 NM57 药物抗体的检测

进一步对 I 期临床中 48 位受试志愿者的血清应用该方法进行检测。

首先, 以志愿者注射前 (0 d) 的血清作为阴性对照 (图 4A), 设定判定阈值 (Cutoff): Cutoff = Mean (阴性对照品) + 3 × SD (阴性对照品)。按照测定结果计算得到: Cutoff = 12.9 + 3 × 7.4 = 35.2, 此值做为判断阴、阳性样品的判定标准, 高于该值即被判定为阳性样品。依此标准对注射后志愿者各采样点的血清检测值进行判定, 各检测点结果均值和标准差如图 4B 所示, 3 个剂量实验组 (各 12 名志愿者) 和对照组 (各 4 名志愿者) 各时间点血清检测值均不超过 30, 低于 35.2 的判定阈值, 表明所有志愿者血清中均未检测

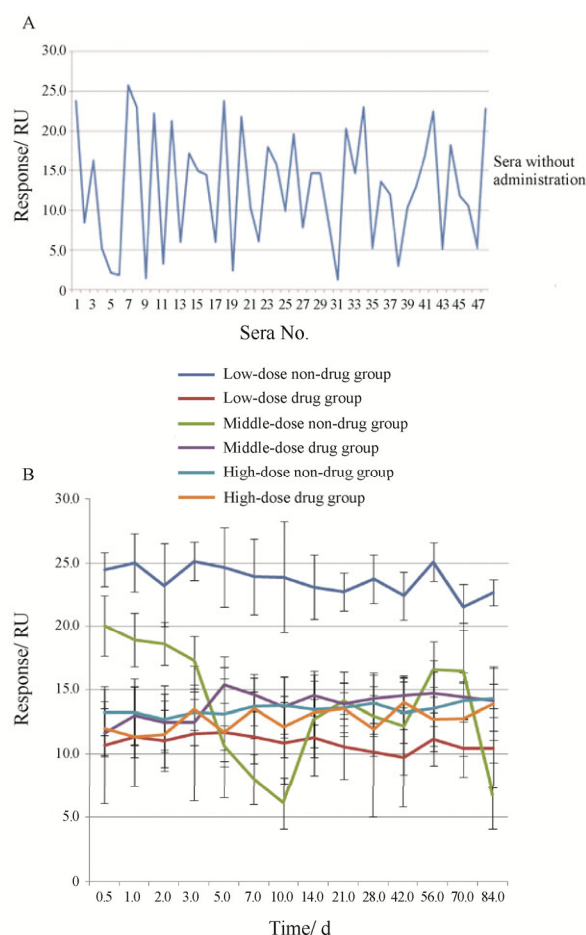


Figure 4 Test results of clinical sera. A: Results of sera without antibody administration; B: Results of low-dose, middle-dose and high-dose group with non-drug or drug

到抗药物抗体。

讨论

应用不同检测方法对同种药物进行免疫原性评估, 所得到的结果略有不同。这种检测结果的差异使生物药物免疫原性很难有统一的评估标准。在 Ⅲ 期临床试验中建立标准检测方法, 对药物免疫原性进行有针对性的评估研究, 对于全面评价其安全性和有效性具有重要意义。目前用于药物免疫原性检测的方法主要有 ELISA、放免沉淀、SPR 等, 其中 SPR 可实现实时、无标记检测, 且快速、灵敏、操作简便, 适用于多种亚型抗药物抗体的检测。另外, 相对于 ELISA 等方法, SPR 法对低亲和力抗药物抗体更为敏感^[10]。

本研究中对 SPR 检测 NM57 抗药物抗体的适用性进行了验证。首先由于没有特异的人源抗 NM57 抗体, 故本实验采用鼠抗 NM57 抗体替代, 用于反映该方法的检测限度。实验结果表明该方法检测限度低于 ELISA 法的一般检测限度。在对方法的检测精密度进行检测时, 分别进行了 3 次平行性实验, 结果显示该方法具有良好的稳定性, 较高的实验精密度和良好的耐用性。作者对用于检测的血清浓度进行摸索, 认为 5 倍稀释人血清作为实验阴性对照品较为合适, 同样将志愿者的血清进行如上处理。实验结果显示, 高、中、低剂量组中, 实验组测定结果均相当或低于对照组, 且所有采样点检测结果均未高于判定阈值。

综上所述, 通过对 SPR 检测 NM57 免疫原性方法的验证, 作者认为 SPR 检测 NM57 免疫原性检测体系灵敏度高、稳定性、耐用性良好、操作简单、抗干扰性强, 达到了抗体药物免疫原性检测方法的基本要求。近年来, 在生物药物免疫原性的研究中, SPR 作为新型的研究方法正在被逐步接受, 与传统的 ELISA 方法形成优势互补, 有助于全面评价药物的免疫原性。

References

[1] Lü QJ. Current status and challenge of biopharmaceutical

immunogenicity [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2007, 16: 181-188.

- [2] Nechansky A. HAHA – nothing to laugh about. Measuring the immunogenicity (human anti-human antibody response) induced by humanized monoclonal antibodies applying ELISA and SPR technology [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51: 252-254.
- [3] Chen X, Jiang Y, Rao KM, et al. Application of surface plasmon resonance technology in screening protein expression of human serum samples [J]. J Environ Occup Med (环境与职业医学), 2010, 27: 261-265.
- [4] Hale G, Rebello P, Brettman LR, et al. Blood concentrations of alemtuzumab and antiglobulin responses in patients with chronic lymphocytic leukemia following intravenous or subcutaneous routes of administration [J]. Blood, 2004, 104: 948-955.
- [5] Overton RD. Ligand binding assays and anti-drug antibodies, analytical approaches and validation issues [J]. Chromatographia, 2002, 55: S101-S106.
- [6] Mire-Sluis AR, Barrett YC, Devanarayan V, et al. Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products [J]. J Immunol Methods, 2004, 289: 1-16.
- [7] Stubenrauch K, Wessels U, Vogel R, et al. Evaluation of a biosensor immunoassay for simultaneous characterization of isotype and binding region of human anti-tocilizumab antibodies with control by surrogate standards [J]. Anal Biochem, 2009, 390: 189-196.
- [8] Ritter G, Cohen LS, Williams C Jr, et al. Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33 [J]. Cancer Res, 2001, 61: 6851-6859.
- [9] Hart MH, de Vrieze H, Wouters D, et al. Differential effect of drug interference in immunogenicity assays [J]. J Immunol Methods, 2011, 372: 196-203.
- [10] Lofgren JA, Dhandapani S, Pennucci JJ, et al. Comparing ELISA and surface plasmon resonance for assessing clinical immunogenicity of panitumumab [J]. J Immunol, 2007, 178: 7467-7472.