

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.003

· 研究快报 ·

抗体偶联药物抗 HER2 单抗-MCC-DM1 细胞毒活性检测方法的建立及其检测效果评价

王兰, 刘春雨[△], 张峰, 于传飞, 郭玮, 王文波, 李萌, 高凯(中国食品药品检定研究院, 单克隆抗体产品室, 北京 100050)

[摘要] **目的:** 建立抗体偶联药物(antibody-drug-conjugate, ADC)抗人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)人源化单抗-MCC-DM1 的细胞毒活性检测方法, 并评价该药抗体偶联前后药物细胞毒活性的变化。**方法:** 供试品为抗 HER2-MCC-DM1 原液及成品各 3 批, 以抗 HER2 人源化单抗和抗 HER2 单抗-MCC-DM1 标准品为参考品, 利用 CCK-8 法、双荧光染色实验分别检测供试品和参考品对人乳腺癌 BT-474 细胞增殖的抑制作用, 计算供试品相对百分效价, 并比较抗体偶联前后该药细胞毒活性的改变; 光学显微镜和荧光显微镜观察抗体偶联前后对 BT-474 细胞生存的影响。**结果:** 抗 HER2-MCC-DM1 供试品及参考品在肿瘤细胞增殖抑制实验中均存在量效关系。3 批原液和 3 批成品各经 3 次测定, 对 BT-474 细胞增殖抑制活性的相对百分效价平均值在 $(92.50 \pm 8.80)\%$ ~ $(115.14 \pm 6.09)\%$, 变异系数均小于 15%。与抗 HER2 单抗原液相比, 对应批次的抗 HER2-MCC-DM1 原液和成品各经 3 次测定, 细胞增殖抑制活性平均值分别为偶联修饰前抗体活性的 $(326.72 \pm 21.58)\%$ 和 $(315.76 \pm 34.90)\%$ 。与偶联前抗体组相比, 抗体偶联药物组细胞固缩和死亡明显增多。**结论:** 所建立的体外细胞增殖抑制法可用于抗体偶联药物抗 HER2-MCC-DM1 的细胞毒活性检测, 其重复性好、准确性高, 可应用于 ADC 药物的质量控制及有效性评价。

[关键词] 单克隆抗体; 抗体偶联药物; 抗 HER2-MCC-DM1; 细胞毒活性; 质量控制

[中图分类号] R967; R30.51; R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)04-0371-05

Development and evaluation of detective methodology for cytotoxic activity of an anti-human epidermal growth factor receptor-2-MCC-DM1 against breast cancer cells

Wang Lan, Liu Chunyu[△], Zhang Feng, Yu Chuanfei, Guo Wei, Wang Wenbo, Li Meng, Gao Kai (Division of Monoclonal Antibodies, National Institutes for Drug and Food Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To develop and evaluate the methodology for biological assessment of anti-HER2-MCC-DM1, an antibody-drug-conjugate (ADC) consisting of an anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) monoclonal antibody conjugated to the maytansinoid emtansine (DM1) via nonreducible thioether linkage (MCC) in breast cancer cells. **Methods:** Representative samples were collected from three batches of bulk drug and three batches of final products, along with the manufacturer's validated reference standard. Breast cancer BT-474 cells were treated with the test samples and reference standard respectively. Five days after treatment, cell proliferation inhibition and cell viability were determined by colorimetric assay using a commercial cell counting kit and dual fluorescent staining analysis. Experiments were repeated three times. **Results:** Both test samples and reference standard of anti-HER2-MCC-DM1 inhibited BT-474 cell proliferation in a dose-dependent manner. The variation coefficient of percent inhibition within the three experiments was

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(No. 2014ZX09304311-001, No. 2012ZX09304010)。Project supported by the National Science and Technology Major Projects for “Major New Drug Innovation and Development” (No. 2014ZX09304311-001, No. 2012ZX09304010)

[作者简介] 王兰(1977-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 博士, 副研究员, 主要从事生物技术药物质量控制研究, E-mail: iamouran@163.com; 刘春雨(1976-), 女, 辽宁省本溪市人, 硕士, 助理研究员, 主要从事单克隆抗体药物质量控制研究, E-mail: foxfoxive@163.com。△共同第一作者

[通信作者] 高凯(Gao Kai, corresponding author), E-mail: gaokai@nifdc.org.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.003.html>

less than 15% for both test samples and reference standard. Compared with the nude anti-HER2 antibody, the bulk drug and final product increased BT-474 cell proliferation inhibition by (326.72 ± 21.58)% and (315.76 ± 34.90)% respectively. HER2-MCC-DM1 effectively induced BT-474 cell shrinkage and death as revealed by both light microscopy and fluorescence microscopy. **Conclusion:** The biological assessment of anti-HER2-MCC-DM1 in breast cancer BT-474 cells *in vitro*, developed in this study, is highly reproducible and accurate, thus offering a promising method for quality control and evaluation of ADCs.

[**Key words**] monoclonal antibody; antibody-drug-conjugate; anti-HER2-MCC-DM1; cytotoxic activity; quality control [Chin J Cancer Biother, 2014, 21(4): 371-375]

抗体偶联药物(antibody-drug-conjugate, ADC)由单克隆抗体、高效应的细胞毒性物质及连接臂三部分组成,它将抗体的靶向性与细胞毒药物的抗肿瘤作用相结合,可以降低细胞毒药物的不良反应,提高肿瘤治疗的选择性,还能更好地应对靶向单抗的耐药性问题,因此近年来受到越来越多的关注^[1-3]。美国 FDA 于 2013 年 2 月批准了罗氏公司的 ADC——抗人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)人源化单抗-MCC-DM1(T-DM1, 商品名 Kadcyla)用于治疗 HER2 阳性的晚期转移性乳腺癌^[4-6]。T-DM1 由抗 HER2 单抗(即曲妥珠单抗)和小分子微管类药物美登醇(maytansinoid, DM1)偶联而成^[7-8]。2002 年就在我国上市的曲妥珠单抗是乳腺癌治疗领域应用最广的第一个分子靶向药物,其适应证是 HER2 阳性的乳腺癌患者^[9-11]。DM1 是抑制微管蛋白聚合导致细胞因有丝分裂障碍而死亡的化合物,机制和长春碱类药物相同,但活性是后者的 20 ~ 100 倍^[12-13]。T-DM1 既保留了曲妥珠单抗依赖性的细胞增殖抑制作用,同时又增加了潜在的细胞毒药物的效应;而且因为其毒素在肿瘤细胞内靶向释放,药物毒副作用并没有随着疗效的增加而同步增大, T-DM1 的临床试验已经证实了其优秀的抗肿瘤活性^[14-15]。为了对此类药物进行有效的质量控制,需要建立准确可靠的生物学活性评价方法。本课题通过人乳腺癌 BT-474 细胞增殖抑制法建立了抗 HER2 单抗-MCC-DM1 的细胞毒活性检测方法,并评价了该药抗体偶联前后细胞毒活性的改变。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

人乳腺癌细胞 BT-474 由本室保存、传代。FBS、DMEM/F12(1:1)培养基和 0.25% Trypsin-EDTA 均购自 Gibco 公司。CCK-8 试剂、钙黄绿素-AM(calcein-AM)和 PI 染料均购自 Dojindo 公司。SpectraMax M5 酶标仪及 SoftMax Pro 分析软件为美

国 Molecular Devices 公司产品。

1.2 供试品与参考品

抗 HER2 人源化单抗原液、3 批抗 HER2-MCC-DM1 原液、3 批抗 HER2-MCC-DM1 成品以及抗 HER2-MCC-DM1 参考品为本室留样。按《中国药典》三部(2010 年版)的要求,对 1 批抗 HER2 单抗原液进行质量控制。

1.3 CCK-8 法检测供试品对 BT-474 细胞增殖的抑制作用

取对数生长期的 BT-474 细胞,经 0.25% Trypsin-EDTA 消化,以含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基重悬细胞,调整细胞密度至 1.5×10^5 个/ml,接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μ l。用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基将供试品从 5 μ g/ml 开始进行 1:2 倍系列稀释,至 0.039 μ g/ml,共 8 个稀释度,每一稀释度设 2 个复孔。将稀释好的供试品转移至已接种 BT-474 细胞的培养板内,50 μ l/孔,混匀后置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下连续培养。培养至第 5 天,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中,显色 4 h,用 SpectraMax M5 酶标仪读取 450 nm 处的光密度(*D*)值。

1.4 双荧光染色法检测供试品对细胞生存的影响

铺板和加样过程同 1.3 项,参考文献[16]的实验方法,取加样后培养至第 5 天的细胞培养板,去除细胞培养液;加 20 μ l 1 mmol/L 的 Calcein-AM 储备液和 30 μ l 1.5 mmol/L 的 PI 储备液至 10 ml PBS 中配制成染色溶液;向上述细胞培养板中加入 100 μ l/孔染色溶液,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 15 min。在荧光显微镜下观察细胞状态,在 490 nm 处激发观察黄绿色的活细胞,同时在 545 nm 处激发观察红色的死细胞。

1.5 统计学处理

利用 SoftMax Pro 软件分析数据,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以供试品浓度为 *X* 轴,对应的 *D* 值为 *Y* 轴,选用的回归模型为四参数方程,绘制每个活性测定板的供试品剂量反应曲线,按以下公式计算供试

品的相对百分效价。

样品的相对百分效价(%) = 抗 HER2-MCC-DM1 参考品的 IC_{50} /抗 HER2-MCC-DM1 原液(或成品) $IC_{50} \times 100\%$ 。

抗体偶联后与偶联前相比的相对百分效价(%) = 抗 HER2 单抗原液的 IC_{50} /对应批次抗 HER2-MCC-DM1 原液(或成品)的 $IC_{50} \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 抗 HER2-MCC-DM1 体外对 BT-474 细胞增殖的抑制活性

CCK-8 检测结果显示,抗 HER2-MCC-DM1 参考品、3 批原液和 3 批成品均存在量效关系,且符合四参数方程式: $Y = (A - D) / [1 + (X/C)^B] + D$, 即在半对数坐标纸上呈典型的反 S 型曲线,相关系数在 0.99 以上,见图 1。3 批原液和 3 批成品经重复检测 3 次, IC_{50} 平均值在 $(0.23 \pm 0.01) \sim (0.26 \pm 0.01) \mu\text{g/ml}$, IC_{50} 值越小,表明供试品的细胞毒活性越高。6 批供试品细胞增殖抑制活性的相对百分效价在 $(92.50 \pm 8.80)\% \sim (115.14 \pm 6.09)\%$, 变异系数均小于 15%,见表 1。

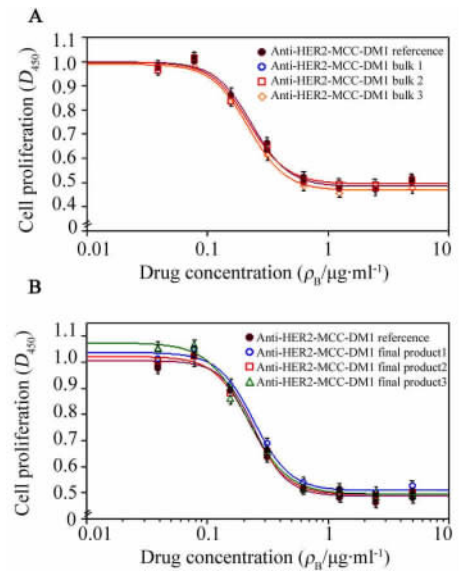


图 1 抗 HER2-MCC-DM1 参考品、原液 (A) 和成品 (B) 体外增殖抑制活性的剂量反应曲线
Fig. 1 Dose-response curves of cell proliferation inhibition for reference, bulk (A) and final product (B) of anti-HER2-MCC-DM1

表 1 抗 HER2-MCC-DM1 原液和成品作用于 BT-474 细胞的 IC_{50} 与相对百分效价 ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Tab. 1 IC_{50} and relative percent potency of bulk and final product of anti-HER2-MCC-DM1 disposed BT-474 cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Sample	Batch	$IC_{50}(\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$		Relative percent potency(%)	
		$\bar{x} \pm s$	CV(%)	$\bar{x} \pm s$	CV
Bulk	1	0.23 ± 0.02	8.70	106.42 ± 6.99	6.57
	2	0.23 ± 0.01	4.35	103.00 ± 2.76	2.68
	3	0.25 ± 0.02	8.00	94.86 ± 6.23	6.57
Final product	1	0.26 ± 0.01	3.85	115.14 ± 6.09	5.29
	2	0.25 ± 0.03	12.00	96.19 ± 11.09	11.53
	3	0.23 ± 0.02	8.70	92.50 ± 8.80	9.51

CV: Coefficient of variation

2.2 抗体偶联前后药物对肿瘤细胞增殖抑制活性的变化

按《中国药典》三部(2010 年版)的要求,对 1 批抗 HER2 单抗原液进行了质量检测,部分结果见表 2,结果说明该批制品各项指标均符合规定。

以该批抗 HER2 抗体原液作为参比,用 CCK-8 法测定对应批次抗 HER2-MCC-DM1 原液和成品的体外增殖抑制活性,结果(图 2)显示,与抗 HER2 单抗原液相比,抗 HER2-MCC-DM1 原液和成品对 BT-474 细胞增殖抑制活性分别为抗体偶联前相应抗体

活性的 $(326.72 \pm 21.58)\%$ 和 $(315.76 \pm 34.90)\%$, 即抗 HER2-MCC-DM1 的细胞毒活性是偶联前抗体单药的 3 倍以上。

2.3 抗 HER2-MCC-DM1 作用后 BT-474 细胞的形态学改变

光学显微镜观察加药后细胞形态学的改变,由图 3 可见,与抗 HER2 抗体单药(图 3A)相比,抗 HER2-MCC-DM1 组(图 3C)细胞明显出现变圆、固缩等现象。通过活死细胞双染试剂^[9]进行细胞存活检测,观察发现,抗 HER2 单抗组荧光显微镜下可

见大量发出绿色荧光的活细胞,只有少许发出红色荧光的死细胞(图 3B);而抗 HER2-MCC-DM1 组可见大量发出红色荧光的死细胞(图 3D)。结果说

明,抗 HER2-MCC-DM1 在抑制细胞增殖的同时也引起靶细胞的死亡。

表 2 抗 HER2 单抗原液部分质量控制结果
Tab. 2 Partial results of quality control of anti-HER2 antibody bulk

Subject	Specification	Method	Result
Biological activity(%)	70-130	BT-474 cell proliferation inhibition	9
Peptide map	Conformed to reference	RP-HPLC	Pass
Purity(%)	≥95.0	SEC-HPLC	96.1
	≥95.0	Non-reduced SDS-PAGE	96.0
	LC + HC ≥95.0	Reduced SDS-PAGE	97.2
	Main peak ≥55.0	IEC-HPLC	66.2
Isoelectric point	Conformed to reference	Isoelectrofocusing	Pass
Identity	Positive, conformed to reference	Western blotting	Pass

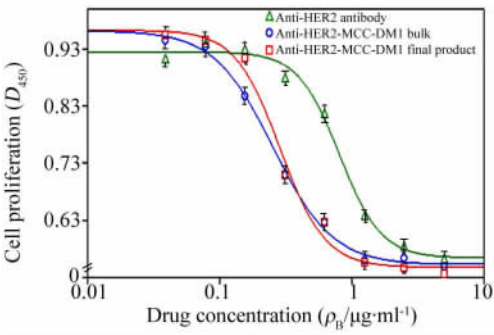


图 2 抗体偶联前后体外增殖抑制活性的剂量反应曲线
Fig. 2 Dose-response curve of cell proliferation inhibition

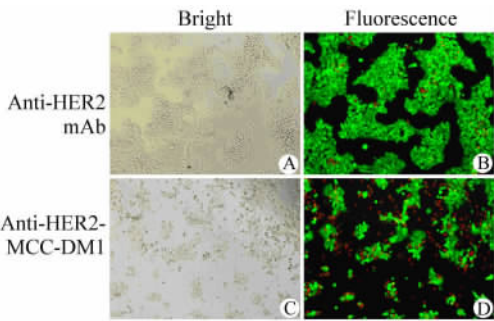


图 3 抗 HER2-MCC-DM1 作用后 BT-474 细胞的形态学改变 (×100)
Fig. 3 Morphological changes of BT-474 cells after treated with anti-HER2-MCC-DM1 (×100)

3 讨论

与单纯的单克隆抗体相比,抗体偶联药物在结构上更加复杂,除了抗体药物具有的质量属性外,还会引入与接头、偶联工艺、负载药物相关的其他关键质量属性,这给 ADC 药物的质量控制带来巨大挑战,其中体外细胞毒活性检测是保证 ADC 药物质量的重要环节^[17-19]。本研究以 ADC 药物抗 HER2-MCC-DM1 为代表,基于人乳腺癌 BT-474 细胞增殖抑制法建立了抗 HER2-MCC-DM1 的体外细胞毒活性检测方法。在结果处理时,使用专门设计的生物制品体外细胞毒活性测定的计算机软件,进一步保证了结果的客观性和准确性。所建立的测活方法具有良好的剂量反应曲线,利用该方法对抗 HER2-MCC-DM1 的 3 批原液和 3 批成品进行测定,与抗 HER2-MCC-DM1 参考品相比,其相对百分效价均在 (92.50 ± 8.80)% ~ (115.14 ± 6.09)% 范围内,相关系数在 0.99 以上。同时对一批抗 HER2 单抗原液进行质量控制检测合格后,以此为参比,用所建立的细胞毒活性测定方法比较了抗体偶联药物与未偶联抗体的体外肿瘤细胞增殖抑制的活性,结果显示抗体偶联药物的体外肿瘤细胞增殖抑制活性比偶联前单抗有 3 倍以上的增加。这一结果与 ADC 药物的设计原理相一致,即在保留抗 HER2 单抗依赖性的细胞增殖抑制作用的同时又增加了潜在的细胞毒药物的细胞杀伤效应。光学显微镜和荧光显微镜观察结果表明,抗体偶联药物组细胞明显出现细胞固缩和死细胞增多现象。临床研究数据也显示,ADC

药物 T-DM1 不同于曲妥珠单抗单药治疗时只使肿瘤生长迟缓的效应,还会引起肿瘤灶逐渐消退。

本研究首次建立了 ADC 药物的细胞毒活性测定方法,并评价了抗体偶联前后药物细胞毒活性的改变,所建立的检测方法稳定可靠、重复性好,不仅可以用于对 ADC 药物的质量控制,而且可以为不同工艺的 ADC 药物结构与功能关系的探讨提供必要的技术手段。

[参 考 文 献]

- [1] Gerber HP, Koehn FE, Abraham RT. The antibody-drug conjugate: An enabling modality for natural product-based cancer therapeutics [J]. Nat Prod Rep, 2013, 30 (5):625-639.
- [2] Beck A, Reichert JM. Antibody-drug conjugates: Present and future [J]. MAbs, 2014, 6 (1): 15-17.
- [3] Perez HL, Cardarelli PM, Deshpande S, et al. Antibody-drug conjugates: Current status and future directions [J]. Drug Discov Today, 2014, 19 (7): 869-881.
- [4] Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with Trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate [J]. Cancer Res, 2008, 68 (22):9280-9290.
- [5] FDA. FDA news release: FDA approves new treatment for late-stage breast cancer [EB/OL]. [2014-03-20]. <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm340704.htm>.
- [6] Dirix LY, Rutten A, Huget P, et al. Trastuzumab emtansine in breast cancer [J]. Expert Opin Biol Ther, 2013, 13 (4): 607-614.
- [7] Krop I, Winer EP. Trastuzumab emtansine: A novel antibody-drug conjugate for HER2-positive breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20 (1): 15-20.
- [8] Yaqub F. T-DM1 for HER2-positive metastatic breast cancer [J]. Lancet Oncol, 2013, 14 (3): e94.
- [9] Tsang RY, Finn RS. Beyond trastuzumab: Novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer [J]. Br J Cancer, 2012, 106 (1): 6-13.
- [10] 安富荣, 刘皋林. 曲妥珠单抗治疗转移性乳腺癌研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9 (4): 294-396.
- [11] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 [J]. N Engl J Med, 2001, 344 (11): 783-792.
- [12] Ojima I. Guided molecular missiles for tumor-targeting chemotherapy-case studies using the second-generation taxoids as warheads [J]. Acc Chem Res, 2008, 41 (1): 108-119.
- [13] Widdison WC, Wilhelm SD, Cavanagh EE, et al. Semisynthetic maytansine analogues for the targeted treatment of cancer [J]. J Med Chem, 2006, 49 (14): 4392-4408.
- [14] Sawaki M. Trastuzumab emtansine in the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer in Japanese patients [J]. Breast Cancer, 2014, 6: 37-41.
- [15] Krop IE, Bearam M, Modi S, et al. Phase I study of trastuzumab-DM1, an HER2 antibody-drug conjugate, given every 3 weeks to patients with HER2-positive metastatic breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28 (16): 2698-2704.
- [16] Chan LL, Wilkinson AR, Paradis BD, et al. Rapid image-based cytometry for comparison of fluorescent viability staining methods [J]. J Fluoresc, 2012, 22 (5): 1301-1311.
- [17] 高凯, 徐志凯, 任跃明, 等. 关于我国药典单克隆抗体类生物治疗药物总论的思考 [J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34 (1): 127-134.
- [18] 王兰, 夏懋, 高凯. 抗体偶联药物的研究进展与质量控制 [J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34 (4): 85-94.
- [19] 高凯, 任跃明, 王兰等. 关于我国药典重组 DNA 技术产品总论的思考 [J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34 (5):107-115.

[收稿日期] 2014 - 04 - 21

[修回日期] 2014 - 07 - 01

[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1) 生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2) 各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMRI*、原癌基因 *RAF1* (人)、病毒癌基因 *v-raf-1* (鼠)、抑癌基因 *p53* (鼠)等。(3) 限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam* H I、*Sal* I 等。(4) 各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数 $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5) 各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外),例如长度 *l*、面积 *A* (或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M_r*、物质的量浓度 *c_B* 等。(6) 化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。(7) 数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8) 英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)