

电化学发光免疫分析法在评价治疗性单抗与 Fc $\gamma$ R I 结合活性中的应用\*

徐刚领, 郭莎, 张峰, 于传飞, 王文波, 王兰\*\*

(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)

**摘要 目的:** 建立电化学发光免疫分析(electrochemiluminescence immunoassay, ECLI)测定贝伐珠单抗与免疫球蛋白 G Fc 段受体 I (Fc $\gamma$ R I) 结合活性的方法, 并评价贝伐珠单抗生物类似药(similar biotherapeutic products, SBP) 候选物和其原研药(reference biotherapeutic product, RBP) 与 Fc $\gamma$ R I 结合活性的相似性。**方法:** 先使用封闭液对链霉亲和素(streptavidin, SA) 预包被的 96 孔 MSD 板进行封闭, 再将生物素(biotin) 标记的 Fc $\gamma$ R I 与之结合, 之后加入不同稀释倍数的贝伐珠单抗, 最后加入 SULFO-TAG (Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>) 标记的羊抗人检测抗体上机读数。按照试验设计分别对 Fc $\gamma$ R I 浓度、单抗样品初始浓度、倍比稀释倍数、检测抗体浓度等试验参数进行优化, 并对优化后方法的准确性和精密性进行初步验证, 还将建立的方法用于评价贝伐珠单抗 SBP 候选药和 RBP 与 Fc $\gamma$ R I 结合活性的相似性。**结果:** 采用优化后的方法检测, 贝伐珠单抗与 Fc $\gamma$ R I 的结合呈现良好的剂量效应曲线,  $R^2 > 0.99$ 。该方法具有较好的准确性和精密性, 靶值为 50%~150% 样品的回收率在 95.2%~103.7% 之间; RSD 均小于 10%。贝伐珠单抗 SBP 候选药与 Fc $\gamma$ R I 的相对结合活性均在为 RBP 相对结合活性均值  $\pm 3SD$  之间。**结论:** 电化学发光免疫分析法能够用于评价抗体与 Fc $\gamma$ R I 的结合活性, 并可应用于对 SBP 候选药和 RBP 与 Fc $\gamma$ R I 结合活性的相似性分析。该方法的灵敏度和准确性较好, 为评价抗体与 Fc $\gamma$ R I 的结合提供了新的技术手段。**关键词:** 单克隆抗体; 贝伐珠单抗; 免疫球蛋白 G Fc 段受体 I (Fc $\gamma$ R I); 电化学发光免疫分析(ECLI); 结合活性

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)01-0039-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.01.05

Application of ECLI in evaluating the binding activity of therapeutic monoclonal antibody to Fc $\gamma$ R I\*

XU Gang-ling, GUO Sha, ZHANG Feng, YU Chuan-fei, WANG Wen-bo, WANG Lan\*\*

(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)

**Abstract Objective:** To establish an electrochemiluminescence immunoassay (ECLI) method for the detection of the binding activity of bevacizumab to immunoglobulin G Fc receptor I (Fc $\gamma$ R I), and to evaluate the

\* 重大新药创制 恶性肿瘤治疗的单抗类生物类似药质量评价研究(2018ZX09736016-007)

\*\* 通信作者 Tel:(010)53852159; E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

第一作者 徐刚领 Tel:(010)53852173; E-mail: xugangling9993@163.com

郭莎 Tel:(010)53852177; E-mail: guosha@nifdc.org.cn

similarity of the binding activity to Fc $\gamma$ R I between the similar biotherapeutic products (SBP) candidates of bevacizumab monoclonal antibody and the original reference biotherapeutic product (RBP). **Methods:** 96 well MSD plate precoated with streptavidin (SA) was blocked firstly, then combined with biotin labeled Fc $\gamma$ R I, and added with different bevacizumab dilutions. Finally, SULFO-TAG (Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>) labeled sheep anti-human antibody was added for value reading. According to the experimental design, the experimental parameters such as Fc $\gamma$ R I concentration, the initial concentration and dilution ratio of mAb, and the concentration of detected Ab were optimized, and the accuracy and precision of the optimized method were preliminarily verified. The established method was also used to evaluate the binding activity similarity between the bevacizumab SBP candidates and bevacizumab RBP to Fc $\gamma$ R I. **Results:** According to the optimized detection method, binding of bevacizumab to Fc $\gamma$ R I showed a good dose-response curve with  $R^2 > 0.99$ . The method possessed good accuracy and precision. The recovery of the sample with target value of 50%~150% was between 95.2% and 103.7%, and the coefficient of variation was less than 10%. The relative binding activities of bevacizumab SBP candidates to Fc $\gamma$ R I were in the range of mean  $\pm$  3SD of that of RBP. **Conclusion:** ECLI can be used to evaluate the binding activity of bevacizumab to Fc $\gamma$ R I, and to analyze the similarity of the binding activity of SBP candidates and RBP to Fc $\gamma$ R I. The sensitivity and accuracy of this method are good, which provides a new technique for evaluating the binding activity of antibody to Fc $\gamma$ R I.

**Keywords:** monoclonal antibody; bevacizumab; immunoglobulin G Fc receptor I (Fc $\gamma$ R I); electrochemiluminescence immunoassay (ECLI); binding activity

抗体类药物不但可通过其抗原结合片段 (antigen binding fragment, Fab) 结合抗原发挥生物学效应,而且可通过可结晶片段 (crystallizable fragment, Fc 段) 发挥作用<sup>[1-3]</sup>。如单抗与靶细胞表面分子结合后,可介导补体 1q (complement 1q, C1q) 结合到抗体的 Fc 段发挥补体依赖的细胞毒效应 (complement dependent cytotoxicity, CDC), 重组抗 CD20、CD52 单抗即是通过测定免疫复合物活化补体产生细胞毒作用后 B 淋巴瘤细胞的死亡评价其生物学活性<sup>[4-6]</sup>; Fc 段也可以通过和不同的 IgG Fc 受体 (crystallizable fragment gamma receptors, Fc $\gamma$ Rs) 结合介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用 (antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP)。人类的 Fc $\gamma$ Rs 分为 Fc $\gamma$ R I、Fc $\gamma$ R II、Fc $\gamma$ R III 3 类,其中 Fc $\gamma$ R I 是一种高亲和力 Fc 受体糖蛋白,多表达在骨髓细胞如单核细胞、巨噬细胞,与抗体 Fc 段结合后可激活信号传导,引起 ADCP,是治疗性抗体通过天然免疫杀伤肿瘤细胞的重要作用机制<sup>[1,3,7-9]</sup>。

ECLI 是将电化学发光和免疫测定相结合的一种标记免疫测定技术,基本原理为电化学发光剂标记的

分子与靶分子在石墨电极板发生结合后,能够在电极表面由电化学引发特异性化学发光反应,光信号可用光学仪器测量,并通过电化学发光信号强度的改变,定量分析电化学发光剂标记的分子与靶分子的结合情况<sup>[10-14]</sup> (图 1)。该方法具有线性范围宽,灵敏度高,背景低,样品用量少等优点,被广泛应用于细胞因子、免疫原性及药代动力学检测<sup>[15-16]</sup>。

本研究利用 ECLI 平台建立了贝伐珠单抗与 Fc $\gamma$ R I 结合活性的测定方法,并评价了 SBP 候选物与 Fc $\gamma$ R I 的相对结合活性,为分析单抗与 Fc $\gamma$ R I 的结合活性提供了新的技术平台。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器和试剂

SECTOR S600 ECLI 检测仪购自 Meso Scale Discovery 公司; Fc $\gamma$ R I -Biotin (CD64, 货号 10256-H27H-B) 购自 Sino Biological 公司。MSD GOLD 96-Well Small Spot Streptavidin Plates (货号 L45SA-5)、Read Buffer T (货号 R92TC-2)、MSD GOLD SULFO-TAG NHS-Ester (货号 R91AO-2) 购自 Meso Scale Discovery 公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自 Gibco 公司, 货号 10010023; 牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Amresco 公司, 货号 0332; Tween 20 (货号 P1379) 购自 Sigma 公司; 封闭液为

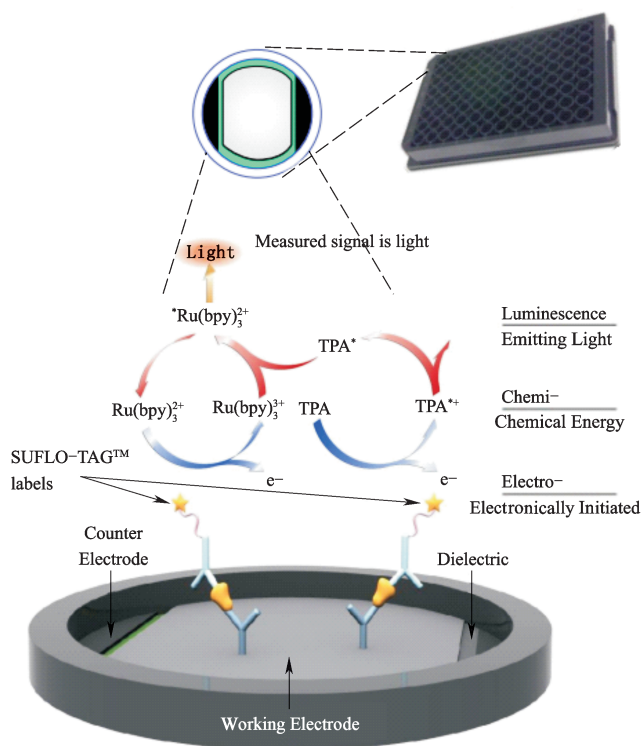


图1 ECLI的原理示意图 ([https://www.mesoscale.com/en/technical\\_resources/our\\_technology/ecl](https://www.mesoscale.com/en/technical_resources/our_technology/ecl))

Fig. 1 The principle sketch of ECLI ([https://www.mesoscale.com/en/technical\\_resources/our\\_technology/ecl](https://www.mesoscale.com/en/technical_resources/our_technology/ecl))

5%BSA/PBS; 稀释液为 1%BSA/PBS; 洗涤液为 0.05% Tween 20/PBS; 羊 F(ab')<sub>2</sub> 抗人 IgG (Fab')<sub>2</sub> (货号 ab98531) 购自 Abcam 公司。贝伐珠单抗 RBP 和贝伐珠单抗 SBP 候选药均为中国食品药品检定研究院 单克隆抗体产品室留样。

## 1.2 方法

**1.2.1** SULFO-TAG 检测抗体的标记 按照说明书在羊 F(ab')<sub>2</sub> 抗人 IgG (Fab')<sub>2</sub> 上标记 SULFO-TAG 作为检测抗体。

**1.2.2** MSD 法检测贝伐珠单抗与 FcγR I 的结合 MSD GOLD 96-Well Small Spot Streptavidin Plates 每孔中加入封闭液 150 μL, 2~8 °C 孵育过夜, 弃去封闭液; 加入用 1%BSA 稀释的不同浓度的 FcγR I-Biotin, 每孔 25 μL, 室温孵育 2 h 后用洗涤液清洗 3 次; 再加入用 1%BSA 稀释的不同浓度的样品, 每孔 50 μL, 室温震荡孵育 1 h 后用洗涤液清洗 3 次; 最后每孔加入 25 μL 检测抗体, 室温孵育 1 h 后用洗涤液清洗 3 次; 每孔加入 Read Buffer T 150 μL, 上机检测读数。

**1.2.3** 方法优化 初步优化包括(1)包被抗原浓度

选择, 将 FcγR I 分别按 0.1、0.3、1.0 μg · mL<sup>-1</sup> 的浓度包被; (2) 样品浓度选择 2 个点 (20、2000 ng · mL<sup>-1</sup>); (3) 检测抗体质量浓度为 0.1、0.3、1.0、3.0 μg · mL<sup>-1</sup>。进一步优化的条件为 0.1、0.3 μg · mL<sup>-1</sup> 包被抗原分别与 0.1、0.3 μg · mL<sup>-1</sup> 检测抗体浓度的组合检测; 贝伐珠单抗浓度以 250 μg · mL<sup>-1</sup> 为起始点, 按 5 倍倍比梯度稀释 11 个浓度点 (共 12 个浓度点)。

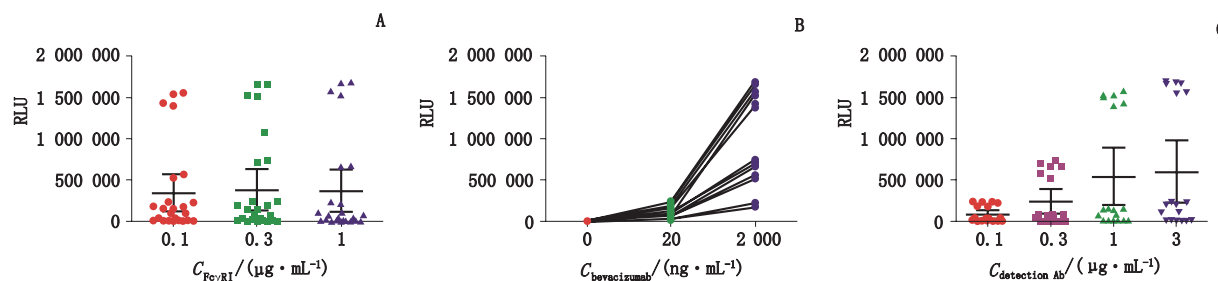
**1.2.4** 方法验证 专属性验证以 1%BSA 代替样品进行检测。准确性验证以 10 μg · mL<sup>-1</sup> 的贝伐珠样品作为参比, 分别制备起始质量浓度为 5.0、7.5、10、12.5 及 15 μg · mL<sup>-1</sup> 的贝伐珠样品, 则其相对生物学活性理论值分别为 50%、75%、100%、125% 和 150%。按照优化后的方法在 3 d 内进行试验, 每个点做 2 个平行复孔, 拟合四参数曲线方程, 根据各样品的 EC<sub>50</sub> 值计算相对生物学活性和回收率; 相对生物学活性测定值 = (参比品 EC<sub>50</sub> / 样品 EC<sub>50</sub>) × 100%, 回收率 = (相对生物学活性测定值 / 相对生物学活性理论值) × 100%。根据不同天的检测结果计算回收率的精密密度。

**1.2.5** 贝伐珠单抗 SBP 候选药物和贝伐珠单抗 RBP 与 FcγR I 结合能力的相似性分析 采用优化好的方法测定 12 批贝伐珠单抗 RBP 和 2 家企业各 3 批贝伐珠单抗 SBP 候选药物与 FcγR I 的结合能力, 每板均带有同一参比品, 所测得的贝伐珠单抗 EC<sub>50</sub> 值均与参比品 EC<sub>50</sub> 值进行比较, 得出相对结合活性, 用来比较与 FcγR I 的结合能力。

## 2 结果

### 2.1 方法优化

将 3 个浓度 (0.1、0.3、1.0 μg · mL<sup>-1</sup>) FcγR I, 3 个浓度 (0、20、2 000 ng · mL<sup>-1</sup>) 贝伐珠单抗, 4 个浓度 (0.1、0.3、1.0、3.0 μg · mL<sup>-1</sup>) 检测抗体进行棋盘法组合检测。从图 2 可见, 3 个 FcγR I 包被质量浓度 1.0、0.3、0.1 μg · mL<sup>-1</sup> 的检测结果没有明显差异 (图 2-A); 0、20、2 000 ng · mL<sup>-1</sup> 贝伐珠单抗的检测结果逐步增高, 说明贝伐珠单抗在 2 000 ng · mL<sup>-1</sup> 仍未达到饱和 (图 2-B), 为进一步选择浓度点提供了参考依据。检测抗体为 1.0 和 3.0 μg · mL<sup>-1</sup> 时信号值没有明显差异, 质量浓度在 0.1、0.3、1.0 μg · mL<sup>-1</sup> 时信号值逐步增高 (图 2-C)。综合考虑信号值和使用的试剂量, 初步选取 FcγR I 包被质量浓度为 0.1、0.3 μg · mL<sup>-1</sup>, 检测抗体质量浓度为 0.1、0.3 μg · mL<sup>-1</sup> 用于试验条件的进一步优化。



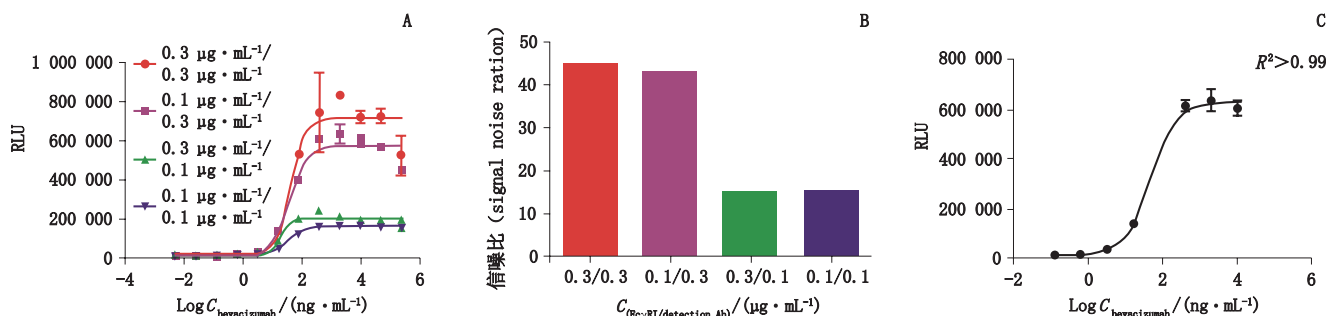
A. Fc $\gamma$ R I 包被浓度优化 (optimization of Fc $\gamma$ R I coating concentration) B. 贝伐珠单抗浓度摸索 (exploration of bevacizumab concentration) C. 检测抗体浓度优化 (optimization of detection Ab concentration)

图 2 ECLI 法测定 Fc $\gamma$ RI 与贝伐珠单抗结合活性的初步方法优化

Fig. 2 Preliminary optimization of Fc $\gamma$ RI and bevacizumab binding activity by ECLI method

进一步优化时将贝伐珠单抗进行了梯度稀释, 起始质量浓度为  $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 按 5 倍倍比梯度稀释 11 个浓度点 ( $250 \sim 0.005 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 结果见图 3-A。可见 4 条拟合曲线  $R^2$  均  $>0.95$ , 当检测抗体浓度固定时, 包被 Fc $\gamma$ R I 质量浓度分别为  $0.1, 0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 最大信号值和信噪比无明显差异; 当 Fc $\gamma$ R I 包被浓度固定时, 检测抗体质量浓度为  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时的最大信号值和信噪比约为检测抗体质量浓度为  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时的 3 倍, 信噪比对比见图

3-B。从剂量反应曲线可见, 所选择的浓度点涵盖了曲线的上平台, 线性段和下平台, 但高浓度和低浓度在上下平台均有 2 个多余的点。根据以上结果, 确定如下参数, 包被 Fc $\gamma$ R I 质量浓度为  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每孔  $25 \mu\text{L}$ ; 样品初始质量浓度为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 5 倍倍比稀释 7 个浓度点 (共 8 个浓度点), 每孔  $50 \mu\text{L}$ ; 检测抗体质量浓度为  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每孔  $25 \mu\text{L}$ 。优化后结果如图 3-C,  $R^2 > 0.99$ , 线性段有 4 个浓度点, 上下平台各 2 个浓度点, 拟合优度和浓度点分布均符合预期。



A. Fc $\gamma$ RI/检测抗体浓度组合的优化 (optimization of Fc $\gamma$ RI concentration and detection Ab combination) B. Fc $\gamma$ RI/检测抗体浓度 4 种组合的信噪比 (signal noise ratio of four concentration combination of Fc $\gamma$ RI concentration and detection Ab) C. 优化后的剂量反应曲线 (dose-response curve after optimization)

图 3 ECLI 法测定 Fc $\gamma$ RI 与贝伐珠单抗结合活性的进一步方法优化

Fig. 3 Further optimization of Fc $\gamma$ RI and bevacizumab binding activity by ECLI method

## 2.2 方法验证

对所建立方法的准确度和精密性进行了初步方法学验证。以  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的贝伐珠样品作为参比, 分别制备了靶值为 50%、75%、100%、125% 和 150% 回收率样品, 每天检测 1 次, 连续检测 3 d, 结果见表 1。5 组样品的相对效价平均值分别为  $(51.86 \pm 2.04)\%$ 、 $(77.79 \pm 6.13)\%$ 、 $(103.34 \pm 8.65)\%$ 、 $(126.39 \pm 4.33)\%$  以及  $(142.84 \pm 6.34)\%$ ; 对应回收率分别为  $(103.72 \pm 2.04)\%$ 、 $(103.72 \pm 6.13)\%$ 、

$(103.34 \pm 8.65)\%$ 、 $(101.11 \pm 4.33)\%$  以及  $(95.23 \pm 6.34)\%$ , 回收率均在 80%~120% 之间。5 组样品于 3 d 内检测的 RSD 均小于 10%。以上结果表明该方法的准确性和日间精密性较好。

## 2.3 贝伐珠单抗 SBP 候选药物和贝伐珠单抗 RBP 与 Fc $\gamma$ R I 结合能力的相似性分析

采用建立的方法测定了 12 批贝伐珠单抗 RBP 和 2 家企业各 3 批 SBP 候选药与 Fc $\gamma$ R I 的相对结合活性。由于贝伐珠单抗主要依靠其 Fab 段阻断可

表 1 方法的准确度和精密性验证结果

Tab. 1 Validation results of accuracy and precision of the method

检测次数 (assay)	50% 靶值 (50% of target)		75% 靶值 (75% of target)		100% 靶值 (100% of target)		125% 靶值 (125% of target)		150% 靶值 (150% of target)	
	相对活性 (relative activity) /%	回收率 (recovery) /%	相对活性 (relative activity) /%	回收率 (recovery) /%	相对活性 (relative activity) /%	回收率 (recovery) /%	相对活性 (relative activity) /%	回收率 (recovery) /%	相对活性 (relative activity) /%	回收率 (recovery) /%
1	51.52	103.0	74.74	99.6	94.89	94.9	131.14	104.9	138.80	92.5
2	51.02	102.0	83.28	111.0	112.70	112.7	127.64	102.1	136.51	91.0
3	53.05	106.1	75.34	100.4	102.43	102.4	120.40	96.3	153.21	102.1
均值 (mean)	51.86	103.7	77.79	103.7	103.34	103.3	126.39	101.1	142.84	95.2
RSD/%	2.04	2.04	6.13	6.13	8.65	8.65	4.33	4.33	6.34	6.34

溶性血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 对血管内皮细胞增殖和迁移的促进作用, 其 Fc 段与 Fc $\gamma$ R I 的结合不属于与临床机理对应的生物学活性, 不需与 RBP 进行等效性检验, 而采用了 RBP 检测结果的均值  $\pm$  3SD 作为 SBP 相似性的判定范围。从图 4 可见, 与参比品比较, 12 批 RBP 的相对结合活性在 88.30%~115.38% 之间, 平均值为 104.63%, RSD 为 6.95%。企业 1 的 3 批 SBP 候选药相对结合活性分别为 97.74%、102.17%、89.46%; 企业 2 的 3 批 SBP 候选药相对结合活性分别为 99.86%、99.45%、105.00%。可见企业 1 的相对结合活性均值与 RBP 差距较大, 而企业 2 的相对结合活性均值与 RBP 差距较小, 但 2 家企业的检测结果均在 RBP 检测结果的均值  $\pm$  3SD 之间。

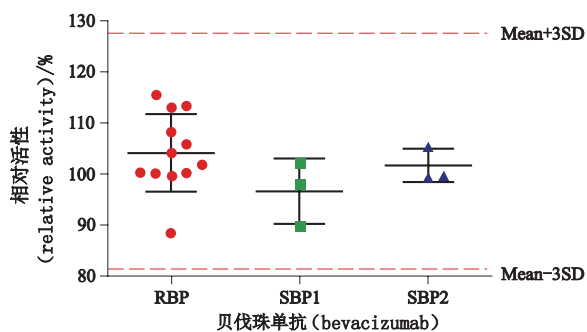


图 4 贝伐珠单抗 RBP 和 SBP 候选药与 Fc $\gamma$ R I 结合活性的相似性比较  
Fig. 4 Comparison of the binding activity of bevacizumab RBP and SBP candidates with Fc $\gamma$ R I

### 3 讨论

本研究优化并建立了基于 ECLI 技术检测 IgG 与 Fc $\gamma$ R I 结合活性的方法, 即使用 SA 预包装的 MSD 板, Fc $\gamma$ R I-Biotin 的包被质量浓度为 0.1

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每孔 25  $\mu\text{L}$ ; 样品初始质量浓度为 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 5 倍比梯度稀释 7 个浓度点 (共 8 个浓度点), 每孔 50  $\mu\text{L}$ ; 检测抗体质量浓度为 0.3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每孔 25  $\mu\text{L}$ 。所测得的剂量反应曲线拟合度较好, 浓度点分布较合理; 经初步验证, 方法的准确性和精密性也较好。目前检测单抗与 Fc $\gamma$ R 结合主要采用 SPR 方法, 亲和力以结合常数表示<sup>[17-18]</sup>, 其试验过程较复杂, 检测通量低, 检测灵敏度为  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  级, 且需要纯化的蛋白进行试验, 另外, 在检测高亲和力分子之间的亲和力时, 由于解离较慢, 可能会导致结果不准确。ECLI 技术可采用 96 孔板进行试验和检测, 操作简单, 通量高; 结果以剂量反应曲线表示, 展示了单抗与 Fc $\gamma$ R I 的生物学结合特性; 其灵敏度可达  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甚至  $\text{fmol} \cdot \text{L}^{-1}$  级, 准确性较高, 线性范围可达  $10^6$ , 且具有良好的抗基质作用, 可使用前期未经纯化的抗体直接检测, 将 Fc 功能评价阶段提前, 是结合活性检测的一种有力方法<sup>[19-20]</sup>。

治疗性单抗的糖基化程度、聚集状态等均能影响其与 Fc $\gamma$ R 的结合活性, 并可能进一步影响单抗的治疗作用。文献也显示单抗与 Fc $\gamma$ R 的结合特性能反映糖基化程度与聚集状态的改变, 如 IgG 单抗的 297 位天冬酰胺是糖基化的位点, 该位点去糖基化后可使单抗与 Fc $\gamma$ R 的结合减弱; 单抗 Fc 段核心岩藻糖的缺失能使其与 Fc $\gamma$ R III 的结合增强而并不会使其与 Fc $\gamma$ R I 的结合增强<sup>[2, 21]</sup>。另外, Fc $\gamma$ R I 主要与 IgG 单抗单体结合, 如果单抗聚集, 则结合活性下降。单抗稳定的糖基化图谱和聚体含量有赖于细胞株状态、培养基成分、培养条件、后续纯化、储存运输等一系列参数的严格控制, 是工艺过程与储存运输过程稳定与

否的反映。因此,单抗与 Fc $\gamma$ R 的结合活性能间接反映单抗工艺和储存条件的稳定性。

Fc $\gamma$ Rs 还包括 Fc $\gamma$ R II、Fc $\gamma$ R III, 根据胞浆区的结构不同, Fc $\gamma$ R II 分为 Fc $\gamma$ R II A、Fc $\gamma$ R II B 和 Fc $\gamma$ R II C, 与 Fc 段亲和力相对较低, 有文献报道 Fc $\gamma$ R II A 主要发挥 ADCP 效应; Fc $\gamma$ R III 可分为 Fc $\gamma$ R III A 和 Fc $\gamma$ R III B, 有研究表明 Fc $\gamma$ R III A 是介导单抗发挥 ADCC 效应的主要受体<sup>[8, 22]</sup>。活性测定是对抗体类药物有效成分和含量以及药物效价的测定, 是确保药物有效性的重要质控指标, 所以可能存在 Fc 效应子功能的单抗, 评价其与 Fc $\gamma$ R II 和 Fc $\gamma$ R III 的结合活性也尤为重要。本文建立了单抗与 Fc $\gamma$ R I 结合活性的 ECLI 分析方法, 后续将研究建立单抗与 Fc $\gamma$ R II、Fc $\gamma$ R III 结合能力的分析方法。另外, MSD 还有 U-plex 技术平台, 可以利用一系列特异性的连接子将多种 Fc $\gamma$ Rs 包被在检测孔中的不同位置, 进而检测各分子与单抗 Fc 段的结合, 该方法可以将 Fc 段与各 Fc $\gamma$ Rs 的结合在 1 次试验中完成, 大大简化了试验过程, 为测定单抗与 Fc $\gamma$ Rs 结合活性提供了一种新思路。

#### 参考文献

- [1] BRANDSMA AM, JACOBINO SR, MEYER S, *et al.* Fc receptor inside-out signaling and possible impact on antibody therapy[J]. *Immunol Rev*, 2015, 268(1): 74
- [2] SWISHER JFA, FELDMAN GM. The many faces of Fc $\gamma$ R I: implications for therapeutic antibody function[J]. *Immunol Rev*, 2015, 268(1): 160
- [3] BARNHART BC, QUIGLEY M. Role of Fc-Fc $\gamma$ R interactions in the antitumor activity of therapeutic antibodies[J]. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95(4): 340
- [4] ZHUANG Y, XU W, SHEN Y, *et al.* Fc $\gamma$  receptor polymorphisms and clinical efficacy of rituximab in non-hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2010, 10(5): 347
- [5] GABELLIER L, CARTRON G. Obinutuzumab for relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphomas[J]. *Ther Adv Hematol*, 2016, 7(2): 85
- [6] ELIAS S, KAHLON S, KOTZUR R, *et al.* Obinutuzumab activates Fc $\gamma$ R I more potently than other anti-CD20 antibodies in chronic lymphocytic leukemia (CLL)[J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(6): e1428158
- [7] PINCETIC A, BOURNAZOS S, DILILLO DJ, *et al.* Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(8): 707
- [8] HARGREAVES CE, MJ R, MACHADO LR, *et al.* Fc $\gamma$  receptors: genetic variation, function, and disease[J]. *Immunol Rev*, 2015, 268(1): 6
- [9] YING C, YOU F, JIANG L, *et al.* Gene-modified NK-92MI cells expressing a chimeric CD16-BB- $\zeta$  or CD64-BB- $\zeta$  receptor exhibit enhanced cancer-killing ability in combination with therapeutic antibody[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37128
- [10] ADCOCK JL, BARROW CJ, BARNETT NW, *et al.* Chemiluminescence and electrochemiluminescence detection of controlled drugs[J]. *Drug Test Anal*, 2011, 3(3): 145
- [11] WEI H, WANG E. Electrochemiluminescence of tris(2, 2'-bipyridyl)ruthenium and its applications in bioanalysis: a review[J]. *Luminescence*, 2011, 26(2): 77
- [12] BERTONCELLO P, STEWART AJ, DENNANY L. Analytical applications of nanomaterials in electrogenerated chemiluminescence[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(23): 5573
- [13] MUZYKA K. Current trends in the development of the electrochemiluminescent immunosensors[J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 54: 393
- [14] GROSS EM, MADDIPATI SS, SNYDER SM. A review of electrogenerated chemiluminescent biosensors for assays in biological matrices[J]. *Bioanalysis*, 2016, 8(19): 2071
- [15] KEUSTERMANS GCE, HOEKS SBE, MEERDING JM, *et al.* Cytokine assays: an assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples[J]. *Methods*, 2013, 61(1): 10
- [16] PARTRIDGE MA, PURUSHOTHAMA S, ELANGO C, *et al.* Emerging technologies and generic assays for the detection of anti-drug antibodies[J]. *J Immunol Res*, 2016: 1
- [17] DORION-THIBAudeau J, RAYMOND C, LATTOV E, *et al.* Towards the development of a surface plasmon resonance assay to evaluate the glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the extracellular domains of CD16a and CD64[J]. *J Immunol Methods*, 2014, 408: 24
- [18] DORION-THIBAudeau J, DUROCHER Y, DE CRESCENZO G. Quantification and simultaneous evaluation of the bioactivity of antibody produced in CHO cell culture—The use of the ectodomain of Fc $\gamma$ R I and surface plasmon resonance-based biosensor[J]. *Molr Immunol*, 2017, 82: 46
- [19] ESTEP P, REID F, NAUMAN C, *et al.* High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning[J]. *MAbs*, 2013, 5(2): 270
- [20] DELLA DUCATA D, JAEHRLING J, HÄNEL C, *et al.* Solution equilibrium titration for high-throughput affinity estimation of unpurified antibodies and antibody fragments[J]. *J Biomol Screen*, 2015, 20(10): 1256
- [21] LU J, CHU J, ZOU Z, *et al.* Structure of Fc $\gamma$ R I in complex with Fc reveals the importance of glycan recognition for high-affinity IgG binding[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(3): 833
- [22] BOURNAZOS S, RAVETCH JV. Diversification of IgG effector functions[J]. *Int Immunol*, 2017, 29(7): 303

(本文于 2018 年 11 月 13 日收到)