

IL-17A 单克隆抗体生物学活性检测方法的建立

陈莹莹, 于秀梅, 张驰, 杨丽君, 吴洁, 李宛宸, 郭常闰* (通化东宝药业股份有限公司, 吉林 通化 134000)

摘要: 目的 建立 2 种检测 IL-17A 单克隆抗体的生物学方法。方法 ①利用 BIAcore T200 系统, 基于表面等离子共振技术(surface plasmon resonance, SPR)的分析方法检测 IL-17A 的生物学活性。②采用 IL-6 释放抑制法测定 IL-17A 单克隆抗体生物学活性。结果 采用 SPR 法获得的偶联最佳 pH 值为 5.0, 动力学常数为 $0.100\ 86\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 样品浓度为 $2.062\ 5\sim 33\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; IL-6 释放抑制法检测的曲线拟合常数 R^2 均满足 >0.95 , 相对活性均在 80%~125%, 多次试验的 $\text{RSD}\leq 20\%$, 满足重复性验证标准, 符合要求。结论 2 种检测方法的结果均较好, 可以有效地反映 IL-17A 的生物学活性, 可以简单、快速用于检测 IL-17A 单克隆抗体生物学活性。

关键词: IL-17A; BIAcore; 生物学活性检测; 单克隆抗体

中图分类号: R917

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)06-0808-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20213264

引用本文: 陈莹莹, 于秀梅, 张驰, 等. IL-17A 单克隆抗体生物学活性检测方法的建立[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(6): 808-811.

Establishment of Analytical Method for Biological Activity of IL-17A Monoclonal Antibody

CHEN Yingying, YU Xiumei, ZHANG Chi, YANG Lijun, WU Jie, LI Wanchen, GUO Changrun* (TongHua DongBao Pharmaceutical Co., Ltd., Tonghua 134000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish two analytical method to determine the biological activity of IL-17A monoclonal antibody. **METHODS** ①The biological activity of IL-17A was detected by BIAcore T200 analysis method based on surface plasma resonance (SPR). ②Determine the biological activity of IL-17A monoclonal antibody by IL-6 release inhibition method. **RESULTS** The optimum pH value of coupling obtained by SPR method was 5.0, the kinetic constant was $0.100\ 86\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, and the sample concentration was $2.062\ 5\sim 33\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$. The curve fitting constants R^2 detected by IL-6 release inhibition method met the requirements of >0.95 , the relative activity was 80%~125%, and the RSD of multiple tests was $\leq 20\%$, which met the repeatability verification standard and met the requirements. **CONCLUSION** The results of the two detection methods are good, which can effectively reflect the biological activity of IL-17A, and can be used to detect the biological activity of IL-17A monoclonal antibody simply and quickly.

KEYWORDS: IL-17A; BIAcore; biological activity test; monoclonal antibody

目前, BIAcore T200 作为实时定量检测生物大分子之间相互作用的仪器被逐渐广泛使用^[1], 其采用表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)技术建立生物学活性检测方法被应用于生物制药领域^[2]。它的优点在于操作简单快速, 实验周期较短, 样品消耗量较少, 目前已被应用于检测生物分子间的亲和力以及动力学分析等, 在检测核酸、蛋白质等大分子方面应用前景十分广阔^[3]。

白细胞介素-17A(interleukin-17, IL-17A)是一种促炎性细胞因子^[4], 作为 IL-17 家族(包括 IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E 和 IL-17F)的成员, 在一些炎症疾病中均有明显表现, 如类

风湿性关节炎、系统性红斑狼疮^[5]、银屑病等。据有关文献报道, IL-17A 与受体结合后, 通过活化 MAP 激酶和 NF- κ B, 诱导炎症细胞因子 IL-6、急性反应蛋白等表达, 从而在疾病的发展过程中发挥重要作用^[6]。IL-17A 单克隆抗体能够与 IL-17A 特异性结合, 阻断 IL-17A 与受体结合, 减少 IL-6 的分泌。通过对 IL-6 细胞因子的含量检测, 能够间接检测到 IL-17A 单克隆抗体的生物学活性。同时, 本实验中加入了 IL-17A 和 TNF- α 2 种蛋白, 能够强烈地刺激细胞产生 IL-6 细胞因子, 增强实验的响应值和信号值, 使结果更精准、更稳定。

本研究旨在采用 SPR 法以及 IL-6 释放抑制法

基金项目: 吉林省科技发展规划项目(20190304040YY)

作者简介: 陈莹莹, 女, 硕士, 中级工程师 E-mail: chyy@thdb.com
331965881@qq.com

*通信作者: 郭常闰, 男, 博士, 高级工程师 E-mail:

测定 IL-17A 单克隆抗体生物学活性^[7], 为 IL-17A 单克隆抗体生物学活性测定提供检测方法, 也为生物仿制药及其类似物的生物活性检测方法提供参考^[8]。

1 材料

1.1 单克隆抗体及细胞

HDF 细胞(ATCC 公司, 批号: PCS-201-012); 参考品苏金单抗(诺和诺德公司, 批号: SAN23); IL-17A 单克隆抗体药物供试品(通化东宝药业股份有限公司, 批号: THDB021-TR3-20180607)。

1.2 试剂

FM 培养基(Sciencell, 批号: 262817); HEPES 钠盐(SIGMA, 批号: SLBV3497); 0.25%Trypsin EDTA(GIBCO, 批号: 2059908); 重组人 IL-17A(R&D, 批号: 9024605); TNF- α 重组蛋白(Abcam, 批号: GR3233899-1); 1 $\times$ PBS(GIBCO, 批号: 2081849); Trypan Blue(SIGMA, 批号: RNBG4319); FBS(Sciencell, 批号: 24548); IL-6(human)AlphaLISA Biotin-free Detection Kit(PerkinElmer, 批号: 2571359); IL-6 标准品(PerkinElmer, 包含在 AlphaLISA Biotin-free Detection Kit 试剂盒内); (10 $\times$)HBS-EP Buffer(批号: BCB05201)、Glycine-HCL 1.5(批号: 28552)和 ProteinA 芯片(批号: 10270554)均购自 GE。

1.3 仪器

SpectraMax i3x 酶标仪(Molecular Devices 公司); HERACELL 240i 型 CO₂ 培养箱(Thermo)、Countess II 细胞计数仪、CY509109CN 液氮罐(Thermo); BSC-1600 II A2 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司); CKX41 倒置显微镜(Olympus); L500 台式低速离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机有限公司); HYCD-282C 医用冷藏冷冻箱(Haier); Biacore T200 分子互作分析系统(GE); Arium mini 超纯水机(Sartorius); MLX-210 迷你离心机(Crystal); G560E 振荡器(Scientific Industries)。

2 方法

2.1 苏金单抗与重组人 IL-17A 受体的动力学分析

将苏金单抗偶联到 ProteinA 芯片上, 以 HBS-EP 缓冲液为工作缓冲液, 用 pH 5.0 的 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ 醋酸钠缓冲液稀释苏金单抗至终浓度为 1 μ g $\cdot$ mL⁻¹。将重组人 IL-17A 用 HBS-EP 缓冲液稀释至 33, 16.5, 8.25, 4.125 及 2.062 5 nmol $\cdot$ L⁻¹。以 50 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的甘氨酸(pH 9.5)作为再生液, 采

用多循环动力学分析, 分析配体与受体的相互作用, 所得数据根据分析软件拟合, 以时间为横坐标, 响应值为纵坐标, 计算动力学常数。

2.2 IL-6 释放抑制法检测 IL-17A 单克隆抗体生物学活性

取对数期 HDF 细胞, 用生长培养基稀释细胞, 使细胞密度达到 2 $\times$ 10⁵ $\cdot$ mL⁻¹, 在 96 孔板中每孔加入 100 μ L 的 HDF 细胞, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养 24 h。向生长培养基中加入 IL-17A 和 TNF- α 重组蛋白。进行 5 倍浓度梯度稀释, IL-17A 终浓度为 30 pmol $\cdot$ L⁻¹, TNF- α 终浓度为 60 pmol $\cdot$ L⁻¹, 共 9 个稀释度。96 孔板细胞去除上清培养基, 加入 9 个浓度梯度的样品和一个空白样品稀释液, 每孔 100 μ L, 放入 CO₂ 中培养 72 h; 在一块新的全白色 96 孔细胞板(检测板)中, 将预稀释好的 IL-6 标准品溶液以每孔 5 μ L 加到 96 孔板, 2 个复孔, 将培养后的细胞上清混匀后以每孔 5 μ L 加到 96 孔板中, 向每孔中加入 20 μ L 2.5 $\times$ MIX, 轻微振荡 30 s 后 23 $^{\circ}$ C 孵育 60 min; 之后每孔加入 25 μ L 2 $\times$ SA-Donor beads, 轻微振荡 30 s 后 23 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 结束后将全白色 96 孔细胞板(检测板)置酶标仪中, 发射光为 570 nm, 激发光为 680 nm 下读取数值, 进行数据分析, 并根据测定结果计算供试品的生物学活性。供试品生物学活性(%)=参考品 EC₅₀/供试品 EC₅₀ $\times$ 100%。

3 结果与分析

3.1 检测抗体动力学常数的 BIAcore 法

采用 BIAcore 法检测苏金单抗与重组人 IL-17A 受体的动力学常数, 试验结果显示, 样品最佳浓度范围为 2.062 5~33 nmol $\cdot$ L⁻¹, 偶联最佳 pH 值 5.0; 5 次试验的重组人 IL-17A 单克隆抗体的平均动力学常数为 0.100 86 nmol $\cdot$ L⁻¹, 见表 1 和图 1。

表 1 检测抗体动力学常数的 BIAcore 法的重复性验证
Tab. 1 Repeatability verification of BIAcore method for detecting antibody kinetic constants

试验次数	结合常数(Ka)	解离常数(Kd)	亲和力常数(KD)
1	6.465 $\times$ 10 ⁵	7.106 $\times$ 10 ⁻⁵	0.109 90
2	6.830 $\times$ 10 ⁵	6.780 $\times$ 10 ⁻⁵	0.099 33
3	6.535 $\times$ 10 ⁵	5.630 $\times$ 10 ⁻⁵	0.086 15
4	5.368 $\times$ 10 ⁵	6.540 $\times$ 10 ⁻⁵	0.121 80
5	6.648 $\times$ 10 ⁵	5.792 $\times$ 10 ⁻⁵	0.087 12

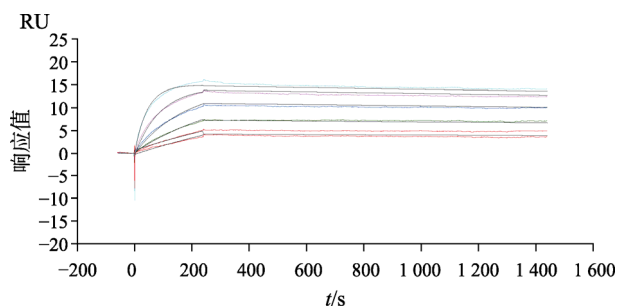


图 1 IL-17A 的动力学分析

Fig. 1 Kinetic analysis of IL-17A

基于 SPR 技术检测不同浓度的 IL-17A, 在 BIAcore T200 上分析仪上的结果显示, BIAcore 法试验 5 次所获的亲和力常数 K_d 值相近, 结合图 1 曲线可以较好地反映样品的生物学活性。

3.2 IL-6 释放抑制法检测 IL-17A 单克隆抗体生物学活性

以参考品与供试品的检测值为纵坐标, 样品浓度为横坐标, 之间的量效关系经过 4 参数曲线拟合呈现反 S 型曲线, 见图 2。从中可以看到曲线拟合良好, 相关拟合系数 R^2 均满足 >0.95 , 复孔 CV 值均 $<20\%$, 根据供试品生物学活性计算公式 [供试品生物学活性 (%) = 参考品 EC_{50} / 供试品 $EC_{50} \times 100\%$], 以参考品作为对照, 计算出供试品的生物学活性为 123%。ELISA 原始数据见表 2~3。

表 2 IL-17A 单克隆抗体供试品酶标仪读板结果

Tab. 2 Plate reading results of IL-17A monoclonal antibody test sample microplate reader

供试品 浓度/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	供试品信号值	供试品平 均信号值	CV/%	$EC_{50}/$ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$
100	21 226 24 595	22 910.5	10.398	
20	17 266 18 777	18 021.5	5.929	
4	18 498 22 772	20 635	14.646	
0.8	34 393 38 936	36 664.5	8.762	
0.16	68 870 89 375	79 122.5	18.325	0.315
0.032	96 652 104 861	100 756.5	5.761	
0.006	85 327 92 824	89 075.5	5.951	
0.001	89 715 96 159	92 937	4.903	
0	107 778 131 428	119 603	13.982	

表 3 IL-17A 单克隆抗体参考品酶标仪读板结果

Tab. 3 Plate reading results of IL-17A monoclonal antibody reference enzyme labeling instrument

参考品 浓度/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	参考品信号值	参考品 平均信号值	CV/%	$EC_{50}/$ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$
100	20 561 20 150	20 355.5	1.428	
20	18 604 18 478	18 541	0.481	
4	20 940 22 019	21 479.5	3.552	
0.8	42 654 35 164	38 909	13.612	
0.16	74 808 83 663	79 235.5	7.902	0.386
0.032	104 575 102 857	103 716	1.171	
0.006	77 790 81 732	79 761	3.495	
0.001	94 781 90 307	92 544	3.418	
0	102 544 116 586	109 565	9.062	

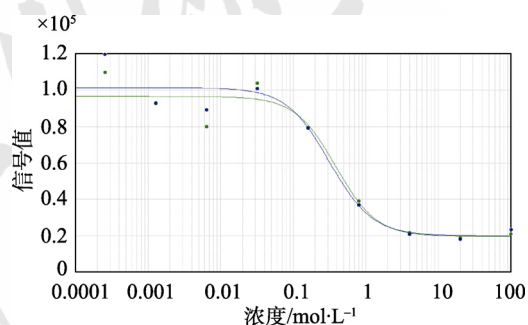


图 2 IL-17A 单克隆抗体供试品和参考品剂量反应曲线

Fig. 2 Dose response curve of IL-17A monoclonal antibody test sample and reference sample

按照上述方法步骤, 保持其他条件相同的情况下, 对同一个供试品进行 6 次重复性试验, 考察所建立方法的可靠性, 计算供试品生物学活性, 以参考品作为对照, 相对活性计算结果见表 4, RSD 为 17.3%, 满足方法重复性的验证要求。

表 4 IL-17A 单克隆抗体药物生物学活性检测方法重复性验证

Tab. 4 Repeatability verification of IL-17A monoclonal antibody drug biological activity test method

重复次数	相对活性	平均值	RSD
第 1 次	81.2		
第 2 次	87.2		
第 3 次	81.5		
第 4 次	97.5	94.5	17.3
第 5 次	125		
第 6 次	94.7		

4 讨论

IL17-A 单克隆抗体在质量研究和控制方面与大多数生物仿制药及其类似物一样复杂,尤其对 IL17-A 单克隆抗体生物学活性的检测方法目前依旧没有具体标准,而本研究采用 BIAcore 法,基于 SPR 技术检测和细胞方面检测 IL-6 细胞因子的含量,间接表现 IL17-A 单克隆抗体生物学活性。此种方法简便快捷,表达稳定,为生物制品生物学活性检测提供了新的参考。

SPR 技术在药物质量检测与控制方面表现良好的应用前景,在检测抗体亲和力方面,可以实时监测抗体抗原的结合和解离过程,有灵敏度高、无需标记样品、分析广泛、精确有效的优势。基于 BIAcore T200 分析系统的抗 IL-17A 人源性单克隆抗体生物学活性检测方法,能够有效、精确地检测 IL-17A 单克隆抗体药物的生物学活性,能够有效地应用于 IL-17A 单克隆抗体药物的筛选以及质量控制。

综上所述,本实验建立了 2 种 IL-17A 单克隆抗体活性的检测方法, BIAcore 法的动力学分析 5 次试验的亲和力常数相近,利用细胞检测的 IL-17A 抗体 4 参数曲线拟合良好,线性关系均 >0.95 ,相对活性均在 80%~125%可接受范围内,2 种方法的检测结果均可以较好地反映样品活性。本研究为筛选此类抗体提供了多种生物学活

性检测方法,也为将来筛选其他生物类制品提供参考。

REFERENCES

- [1] MA C M, HUANG X X, CAO Z L, et al. Study on biological activity of adalimumab based on Biacore T200 system[J]. World Clin Drugs(世界临床药物), 2016, 37(5): 308-313, 323.
- [2] ZHANG R. The interaction technology for Biacore molecular accelerates the R & D and declaration of antibody drug[J]. Process(流程工业), 2020(2): 30-32.
- [3] LEE A, QIAO Y, GRIGORIEV G, et al. Tumor necrosis factor α induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts[J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(4): 928-938.
- [4] MAO Y Y, ZHANG L, WANG B, et al. Analysis of bioactivity of the new-developed cetuximab injection[J]. Lett Biotechnol(生物技术通讯), 2016, 27(3): 421-426.
- [5] ZHOU C M, MA X X, ZHOU J Y, et al. Development and comparison of methods for determination of biological activity of trastuzumab[J]. Chin J Biol(中国生物制品学杂志), 2011, 24(2): 216-220.
- [6] SCHETT G, GRAVALLESE E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: Mechanisms, diagnosis and treatment[J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(11): 656-664.
- [7] XUE H, WU Q, HU X Y, et al. Effects of anti-HER-2 chimeric antibody chA21 on proliferation and apoptosis of SKBR3 cells[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2007, 23(11): 1463-1466.
- [8] CHENG L S, LIU A P, YANG J H, et al. Construction, expression and characterization of the engineered antibody against tumor surface antigen, p185(c-erbB-2)[J]. Cell Res, 2003, 13(1): 35-48.

收稿日期: 2022-03-28

(本文责编: 曹粤锋)