

【安全性评价】

抗程序性死亡受体1单克隆抗体体外细胞因子释放综合征风险评估

彭伟, 刘忠, 张贵民, 赵丽丽*

山东新时代药业哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室, 山东 临沂 273400

摘要: 目的 选择合适的方法评价抗程序性死亡受体1(PD-1)单克隆抗体在体外引起细胞因子释放的风险。方法 通过抗体与人PBMC细胞共培养6、24 h,并用流式技术评估重组人源化抗PD-1单克隆抗体(F520)和已上市抗PD-1单克隆抗体Opdivo、Keytruda是否存在引起细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)的风险。结果 成功建立了采用人PBMC细胞在体外进行抗PD-1单克隆抗体细胞因子释放的评价技术。结论 与人PBMC细胞的共培养6、24 h, F520、Opdivo和Keytruda在体外均不存在引起CRS的风险。

关键词: 抗PD-1单克隆抗体; F520; 细胞因子释放综合征

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)08-1520-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.08.006

CRS risk assessment of anti-PD-1 monoclonal antibody *in vitro*

PENG Wei, LIU Zhong, ZHANG Guimin, ZHAO Lili

National Engineering Lab. for High Efficiency Expression of the Mammalian Cells, Shandong New Time Pharmaceutical Co. Ltd., Linyi 273400, China

Abstract: **Objective** Choose the appropriate method to evaluate cytokine release syndrome induced by anti-PD1 monoclonal antibody *in vitro*. **Methods** PBMC Cells were cocultured with mAb for 6 and 24 hours. Using FACS, we evaluated the risk of cytokine release syndrome induced by F520, Opdivo and Keytruda. **Results** Successfully established the method to evaluate cytokine release syndrome induced by anti-PD1 monoclonal antibody *in vitro*. **Conclusion** Cocultured with PBMC Cells for 6 and 24 hours, the results strongly emphasized that F520, Opdivo and Keytruda could not induce cytokine release syndrome.

Key words: Anti-PD1 monoclonal antibody; F520; cytokine release syndrome

抗程序性死亡受体1(PD-1)单克隆抗体药效学活性的基础是与人PD-1蛋白的高度亲和并阻断PD-1/程序性死亡受体-配体1(PD-L1)信号通路。Keytruda和Opdivo是目前已上市的阻断PD-1/PD-L1通路的两种药物且具有良好效果,通过阻断PD-1/PD-L1信号通路,解除PD-1通路介导的对免疫应答(包括抗肿瘤免疫应答)的抑制,从而产生抗肿瘤作用,延长生存期^[1-2]。众所周知,单克隆抗体由于靶向性强、特异性高和毒副作用低等特点,成为近年来复合性增长最快的一类生物技术药物。然而,2006年单克隆抗体TGN1412因为诱发了细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS),在I期临床试验中造成了灾难性的后果。本

部分研究主要是通过流式细胞技术评估F520与Opdivo和Keytruda在体外是否存在引起CRS的风险。

1 材料

1.1 实验样品

重组人源化抗PD-1单克隆抗体(F520),山东新时代药业有限公司自制,由CHO细胞发酵,经亲和色谱和离子色谱分离制得,纯度(SEC-HPLC)大于95%,批号161118;Keytruda购自默沙东,批号6SNL81205;Opdivo购自百时美施贵宝,批号AAH3392;Positive control: Anti-CD3抗体购自BD,批号5303682;Isotype Control: Human IgG1购自Calbiochem,批号2782366。外周血液单个核细胞(PBMC)购自澳赛尔斯生物技术有限公司,货号PB005F-C。

收稿日期: 2019-01-24

*通信作者: 赵丽丽(1977—),女,博士后,主要从事抗体药物研发。Tel: 15666872226 E-mail: zhaolili1820@126.com

1.2 实验试剂

IL-2检测试剂盒(批号5338832),IL-4检测试剂盒(批号6064808),IL-6检测试剂盒(批号6120548),IL-10检测试剂盒(批号6127525),TNF- α 检测试剂盒(批号6155762),IFN- γ 检测试剂盒(批号6070712)均购自BD biosciences;淋巴细胞分离液,Axis-Shield PoCAs, Oslo, Norway,批号12HIS02。

2 方法

将人外周血液单个核细胞(PBMC),用含有10%FBS的1640完全培养液重悬细胞并调整细胞密度至 $5 \times 10^6/\text{mL}$,按每孔2 mL接种到24孔板中;配制不同终浓度的待测样品(质量浓度为50、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加入到上述24孔板中,轻微振荡使药物与细胞

充分混合;配制不同终浓度 Positive control: Anti-CD3 抗体(质量浓度为50、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),配制不同终浓度 Isotype Control : Human IgG1(质量浓度为50、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),加入到上述24孔板中,轻微振荡使药物与细胞充分混合。将实验板静置在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中孵育;分别在6、24 h取上清,用流式细胞仪采用CBA方法检测IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 和TNF- α 的释放水平。

3 结果

结果见图1~6,将F520、Opdivo和Keytruda与人PBMC共孵育6、24 h后,未引起IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- α 浓度增高,提示F520、Opdivo和Keytruda体外实验均不存在引起CRS的风险。

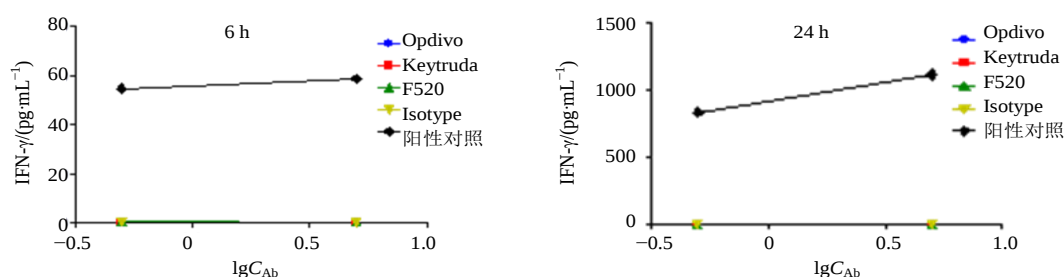


图1 IFN- γ 在6、24 h的释放水平
Fig. 1 IFN- γ release levels at 6 and 24 hours

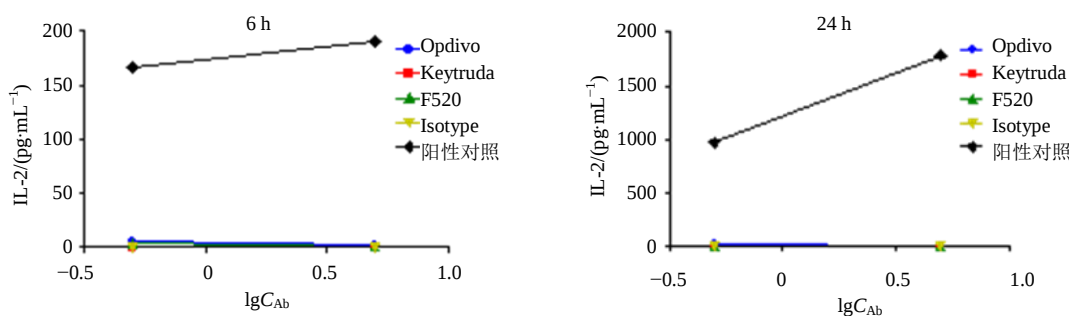


图2 IL-2在6、24 h的释放水平
Fig. 2 IL-2 release levels at 6 and 24 hours

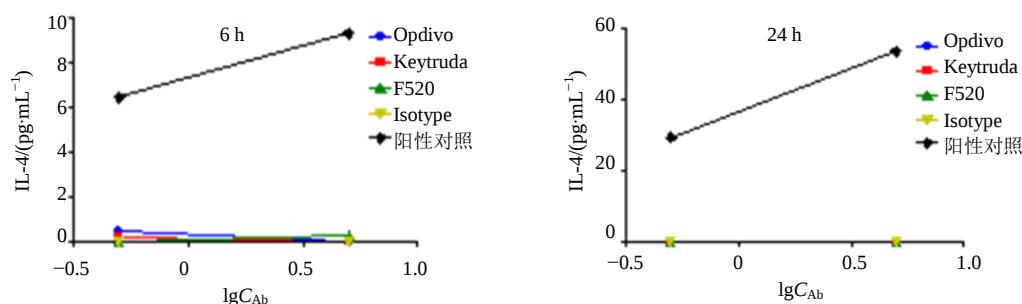


图3 IL-4在6、24 h的释放水平
Fig. 3 IL-4 release levels at 6 and 24 hours

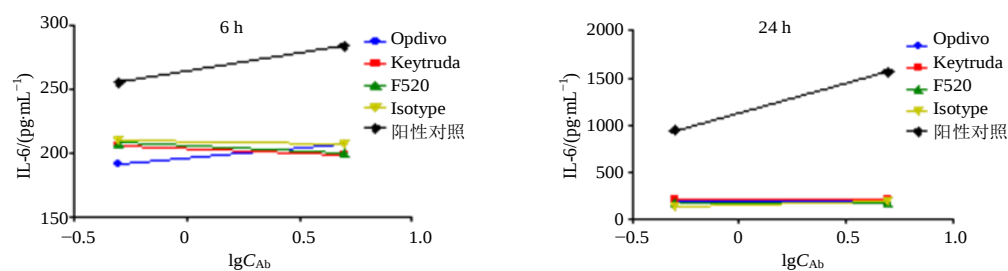


图4 IL-6在6、24 h的释放水平

Fig. 4 IL-6 release levels at 6 and 24 hours

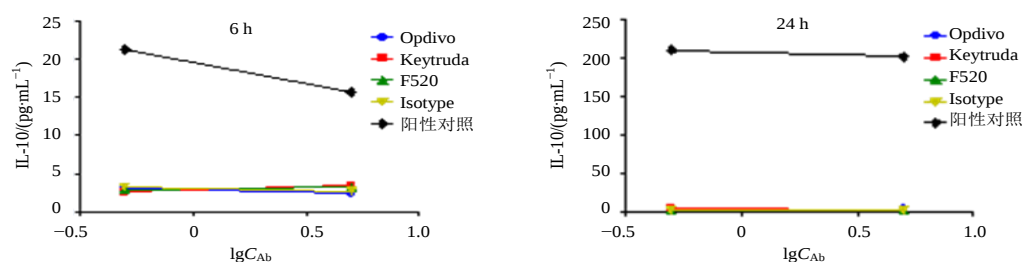


图5 IL-10在6、24 h的释放水平

Fig. 5 IL-10 release levels at 6 and 24 hours

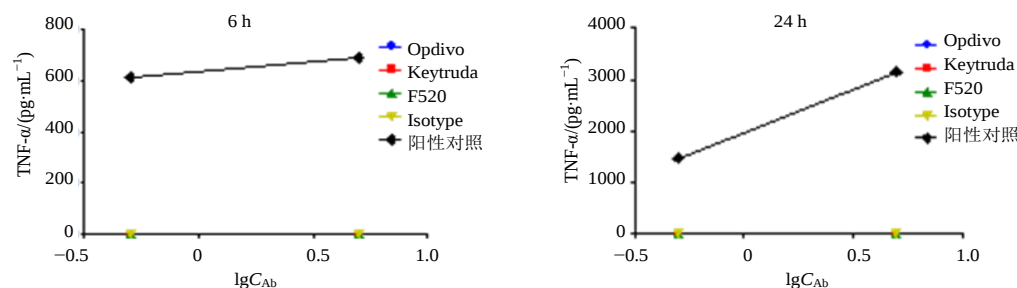


图6 TNF-α在6、24 h的释放水平

Fig. 6 TNF-α release levels at 6 and 24 hours

4 讨论

CRS是指可能超过150炎性介质参与的级联放大的系统性免疫应答,通常认为是某些炎性细胞的活化导致的,尤其是单核细胞、巨噬细胞、T细胞和B细胞。在CRS最初阶段,会出现TNF-α、IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10增高等主要特点。临床病例报道出疲倦、头痛、荨麻疹、瘙痒、鼻炎、支气管痉挛、呼吸困难等症状。2006年3月,单克隆抗体TGN1412在英国1期临床试验中出现的灾难性事件令人震惊,试验组6名健康男性出现了多器官衰竭,其中2名出现深度昏迷。这一严重事件让科学家和药品管理机构对单克隆抗体的研究和审批更加谨慎^[3-5]。评价单克隆抗体的CRS风险显得尤为重要,本次的研究结果表明F520、Opdivo和Keytruda在体外都不存在CRS风险。

参考文献

- [1] Wang C, Thudium K B, Han M, et al. *In vitro* characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and *in vivo* toxicology in non-human Primates [J]. Cancer Immunol Res, 2014, 2(9): 846-856.
- [2] Luan Y, Chai D F, Peng J J, et al. A fully human monoclonal antibody targeting PD-L1 with potent anti-tumor activity [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 31: 248-256.
- [3] 梅恒, 吴耀辉, 郭涛, 等. CAR-T治疗细胞因子风暴中的出血异常、中枢神经系统改变 [J]. 临床血液学杂志, 2016, 29(4): 557-559, 562.
- [4] 林志, 吕建军, 屈哲, 等. 浅析单克隆抗体诱导的细胞因子释放综合征 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(7): 746-750, 756.
- [5] 张亦琳, 赵万红, 张王刚, 等. 托珠单抗治疗CAR-T细胞治疗难治复发多发性骨髓瘤后细胞因子释放综合征的疗效 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(9): 990-994.