

pHSense Eu探针用于基于时间分辨荧光的抗体与抗体偶联药物(ADC)内化实时监测

作者

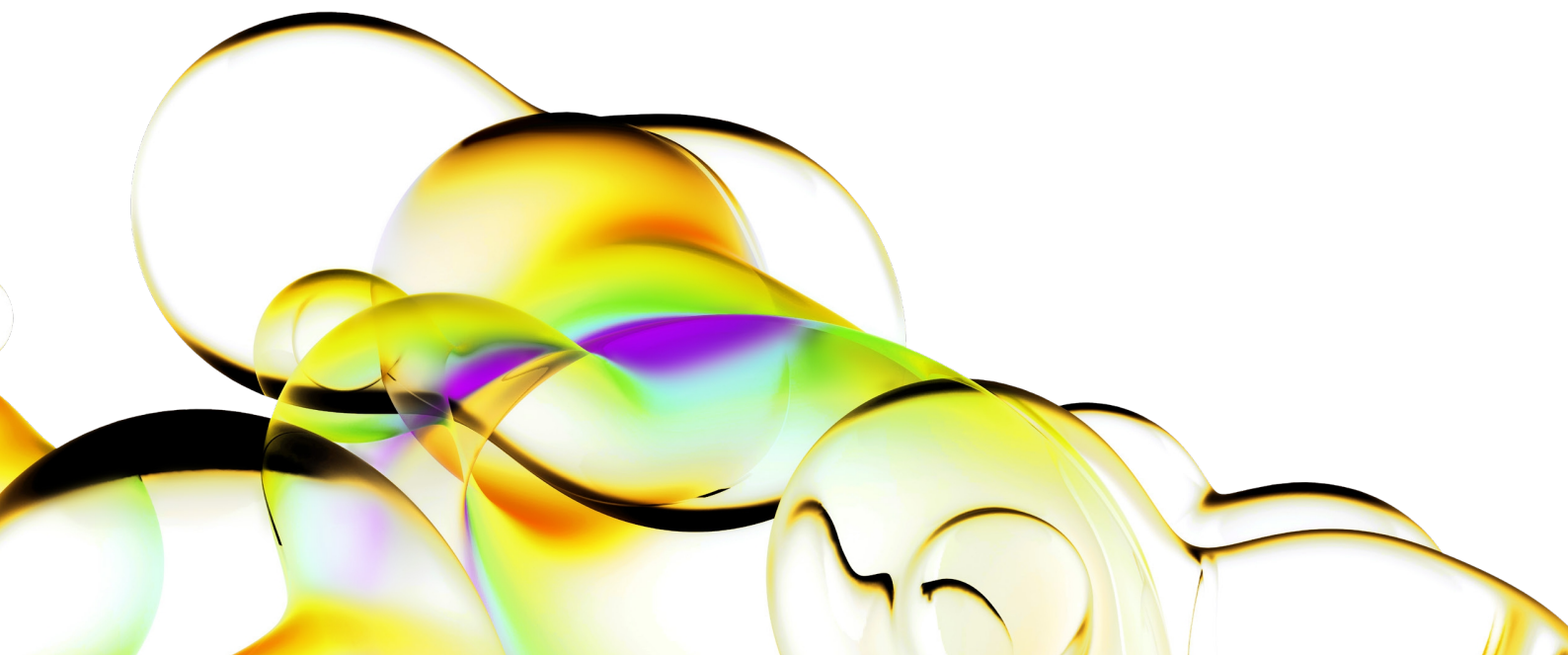
- Ludivine Vossier
- Elodie Dupuis
- Eric Trinquet
- Stéphane Martinez
- Estelle Vandekerkhove
- Fabrice Maurin
- Agathe Contin

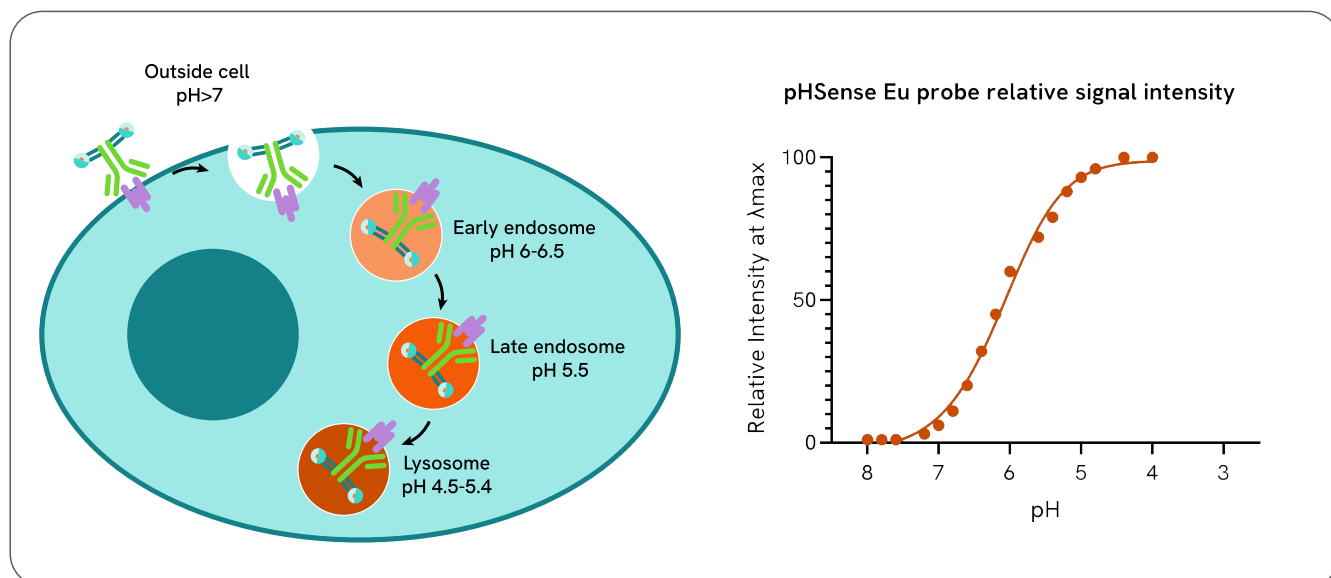
瑞孚迪(Revvity)

引言

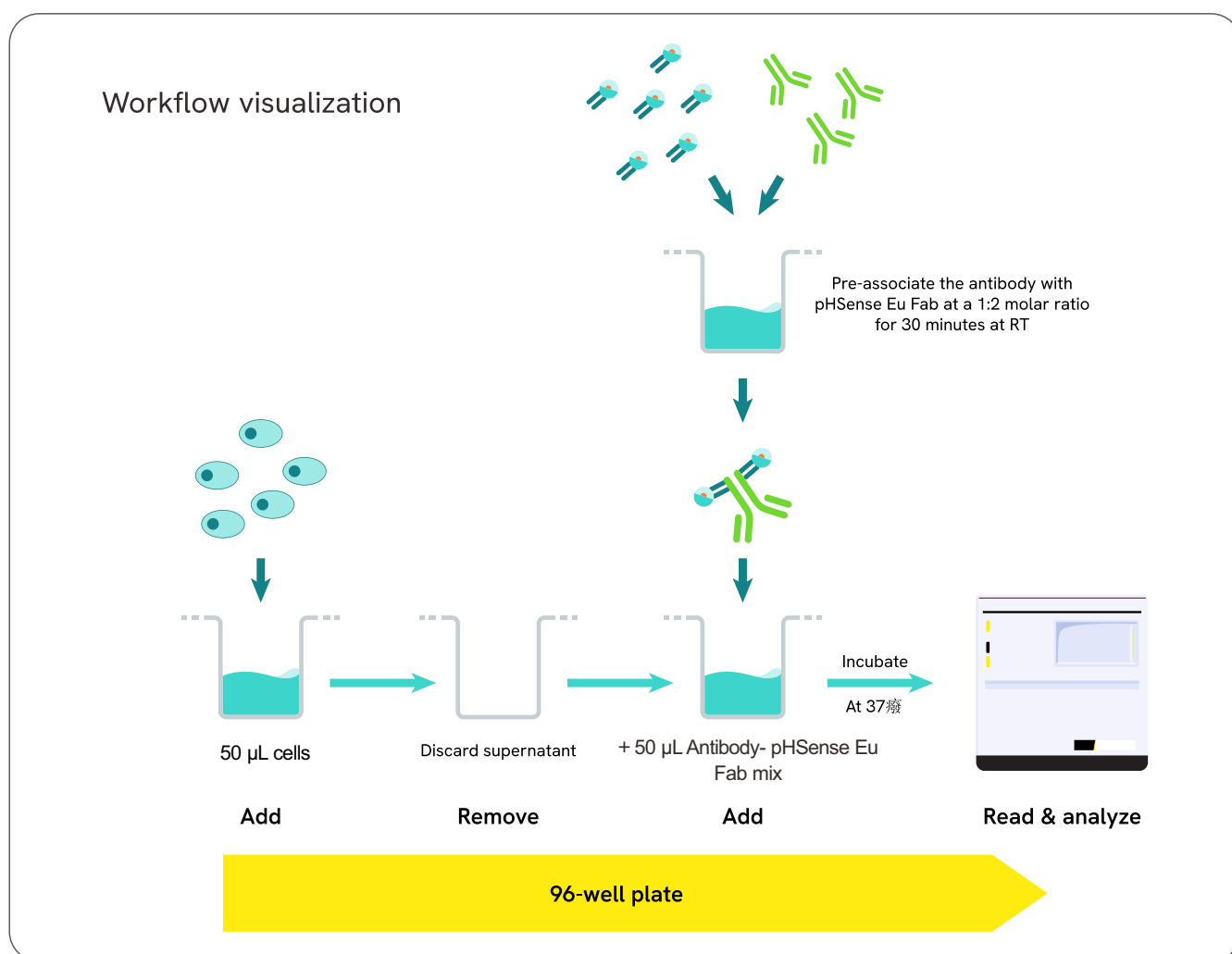
在过去的十年中，监测抗体和抗体偶联药物（ADCs）的内化及细胞内转运已成为一个重要的研究领域。这类治疗药物的发展催生了对先进技术的需求，以表征其内化效率和效力。我们开发了一种新型的免洗、基于微孔板酶标仪的检测方法，该方法支持动力学记录和终点检测，利用新设计的pH敏感型钆标记试剂：pHSense™ Eu，在活细胞中监测抗体和ADCs的内化过程。这些荧光探针具有双重pH敏感性，其亮度和荧光寿命在酸性环境中均会显著增加。与传统的pH敏感染料相比，其独特的光物理特性使其能够进行时间分辨荧光（TRF）检测，有效消除了大部分来自细胞和培养基的背景荧光，并显著提高了信噪比（S/B）。

pHSense Eu Fab试剂是共价钆标记的，旨在实时监测抗体、ADCs以及受体或膜蛋白介导的内化过程。它们适用于在37℃的细胞培养基中进行生理性、基于细胞的内化检测，能以高亲和力结合测试抗体的Fc区域，并在中性细胞外pH（ ≥ 7 ）环境下保持极低的荧光。内化后，pHSense Eu Fab试剂-抗体复合物会进入酸性逐渐增加的胞内区室（如早期内体、晚期内体和溶酶体），在这些区域，钆信号会逐渐增强。





细胞内抗体转运及pHSense Eu探针的pH响应信号激活示意图



详细实验方案请参阅用户手册

实验验证

在碱性和酸性条件下Fab片段对IgG同种型亲和力的表征

1.Fab片段与IgG同种型亲和力的评估

采用HTRF™（均相时间分辨荧光）技术进行饱和结合实验，以表征抗人源和抗鼠源Fab片段对各种IgG同种型的亲和力。简而言之，将Fab片段标记上d2(HTRF红色受体)，并将每种IgG同种型标记上Terbium cryptate（HTRF供体）。将d2标记的Fab滴定到含有固定浓度供体标记IgG的溶液中，以评估总结合和非特异性结合，从而确定Fab-d2与每种IgG同种型的表现Kd值。在恒定且饱和的未标记Fab存在的情况下测量非特异性结合。在无血清的DMEM细胞培养基中于室温孵育1小时后，使用HTRF兼容酶标仪监测时间分辨（TR）FRET信号（图1）。

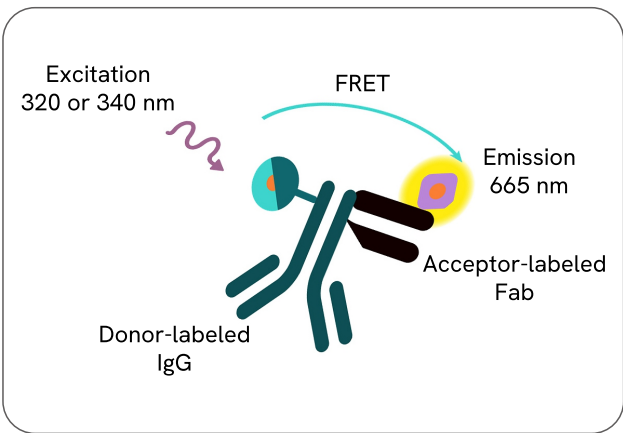


图1: HTRF饱和结合实验原理图

在细胞培养基中，抗人源Fab对所有四种人源IgG同种型均表现出纳摩尔级的高亲和力（表1）。同样，抗小鼠IgG2 Fab对所有三种小鼠IgG2变体均表现出亚纳摩尔级亲和力（表2）。

表1: 抗人源Fab在DMEM细胞培养基中对人源IgG同种型的亲和力

人源IgG同种型	Kd检测值
IgG1	0.99 nM
IgG2	5.34 nM
IgG3	6.77 nM
IgG4	3.36 nM

表2: 抗小鼠IgG2 Fab在DMEM细胞培养基中对小鼠IgG2同种型的亲和力

小鼠IgG2同种型	Kd检测值
IgG2a	0.95 nM
IgG2b	0.31 nM
IgG2c	0.71 nM

2.在碱性和酸性条件下Fab亲和力的评估

使用在pH值范围为5.19至7.41的一系列磷酸盐缓冲液（Stock Options Phosphate Buffer Kit, Hampton Research #HR2-251）中进行的饱和结合实验，评估了抗人源Fab-IgG相互作用在不同pH水平下的稳定性（表3）。在整个测试的pH范围内（包括酸性pH 5.19）观察到相似的解离常数（Kd），表明Fab-IgG结合可能在整个内吞途径中保持稳定。

表3: 抗人源Fab在不同pH条件下对人源IgG1的亲和力

磷酸盐缓冲液pH	Kd检测值
5.19	2.18 nM
6.14	3.22 nM
6.87	2.09 nM
7.41	2.81 nM

在HER2阳性癌细胞中使用pHSense Eu Fab抗人源IgG监测靶向HER2的抗体和ADCs的内化

1.在低表达和高表达HER2的癌细胞系中使用抗HER2内化抗体曲妥珠单抗的示例

将两种表达不同水平内源性HER2受体的癌细胞系BT-474和SK-BR-3(表4),以每孔20,000个细胞的密度接种到96孔白色培养处理板中,在完全细胞培养基中于37℃、5% CO₂条件下过夜孵育。

表4: 通过定量流式细胞术测定的BT-474和SK-BR-3细胞系中HER2膜表达水平(QIFIKIT[®], Agilent)

细胞系	每个细胞的HER2受体数量
SK-BR-3	45,472
BT-474	148,290

将抗HER2内化抗体IgG1曲妥珠单抗在细胞培养基中与pHSense Eu Fab抗人源IgG以1:2的摩尔比在室温下预孵育30分钟。然后将Fab-抗体混合液在细胞培养基中进行系列稀释，向细胞中加入50 μ L不同浓度的稀释液，接着在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下孵育3小时。使用TRF兼容酶标仪记录620nm处的TRF信号。

正如预期的那样，使用无关人源IgG1作为阴性对照未观察到信号增加（数据未显示），而使用曲妥珠单抗则检测到强烈的、剂量依赖性的信号增加。这些结果表明，pHSense Eu Fab抗人源IgG能够特异性检测抗HER2抗体在表达不同水平HER2的细胞中的内化，并且能够测得与先前报道数据一致的EC₅₀值（图2）。

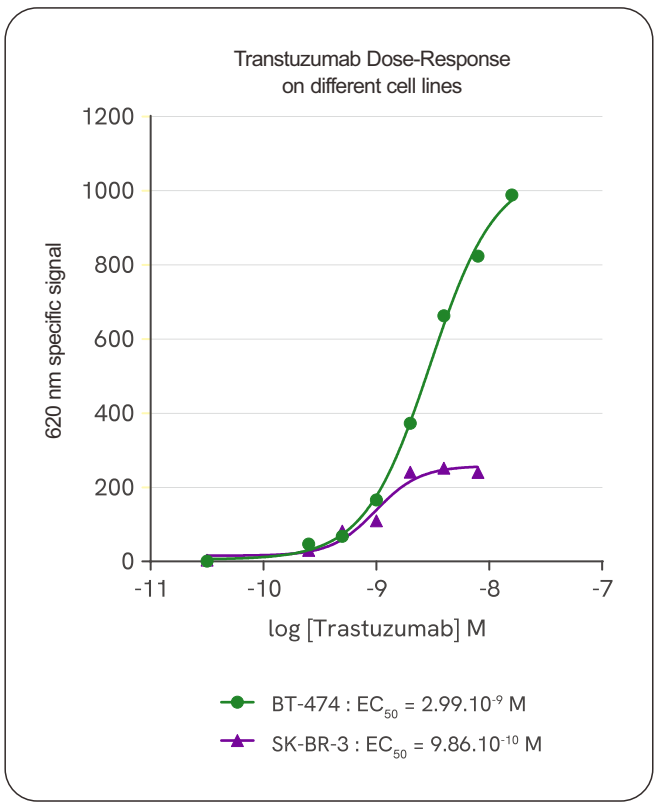


图2: 曲妥珠单抗在不同细胞系上的剂量反应曲线

2.在HER2阳性癌细胞系中使用抗HER2内化抗体曲妥珠单抗及其衍生的ADCs(Kadcyla和Enhertu)的示例

将BT-474细胞以每孔20,000个细胞的密度接种到96孔白色培养处理板中，在完全培养基中于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下过夜孵育。将抗HER2内化抗体IgG1曲妥珠单抗及其两种衍生的ADCs（Kadcyla[®]和Enhertu[®]）在细胞培养基中与pHSense Eu Fab抗人源IgG以1:2的摩尔比在室温下预孵育30分钟。然后将Fab-抗体混合液在细胞培养基中进行系列稀释，向细胞中加入50 μ L不同浓度稀释液，接着在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下孵育1小时。使用TRF兼容酶标仪记录620nm处的TRF信号。

正如预期的那样，使用无关人源IgG1作为阴性对照未观察到信号增加，而强烈的、剂量依赖性的信号增加证实了pHSense Eu Fab抗人源IgG能够特异性检测抗HER2抗体及其ADC衍生物的内化（图3）。结果表明，该检测方法能够测得与先前报道数据一致的EC₅₀值。此外，结果还证明了pHSense Eu检测法在表征具有不同类型有效载荷（payloads）、连接子（linker）化学结构和不同药物抗体比（DAR）的ADCs方面的兼容性。

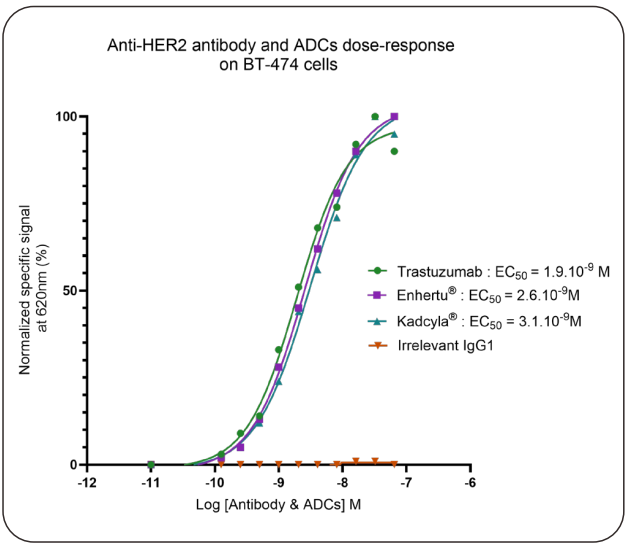


图3: 在BT-474细胞上检测抗HER2抗体和ADCs的内化

使用pHSense Eu Fab抗小鼠IgG2在EGFR阳性癌细胞中监测靶向EGFR的抗体的内化

将高表达内源性表皮生长因子受体（EGFR）（约420,000个受体/细胞；通过定量流式细胞术[QIFIKIT[®], Agilent]测定）的乳腺癌腺癌细胞以每孔50,000个细胞的密度接种到96孔白色培养处理板中，在完全培养基中于37℃、5% CO₂条件下过夜孵育。将小鼠IgG2抗人源EGFR内化抗体在细胞培养基中与pHSense Eu Fab抗小鼠IgG2以1:2的摩尔比在室温下预孵育30分钟。然后将Fab-抗体混合液在培养基中进行系列稀释，向细胞中加入50μL每种稀释液，接着在37℃、5% CO₂条件下孵育4小时。使用TRF兼容酶标仪记录620 nm处的TRF信号。

正如预期的那样，使用无关小鼠IgG2作为阴性对照未观察到信号增加，而使用抗EGFR抗体则检测到强烈的、剂量依赖性的信号增加。这些结果表明，pHSense Eu Fab抗小鼠IgG2能够特异性检测抗EGFR抗体的内化，并能够测得与先前报道数据一致的EC₅₀值（图4）。

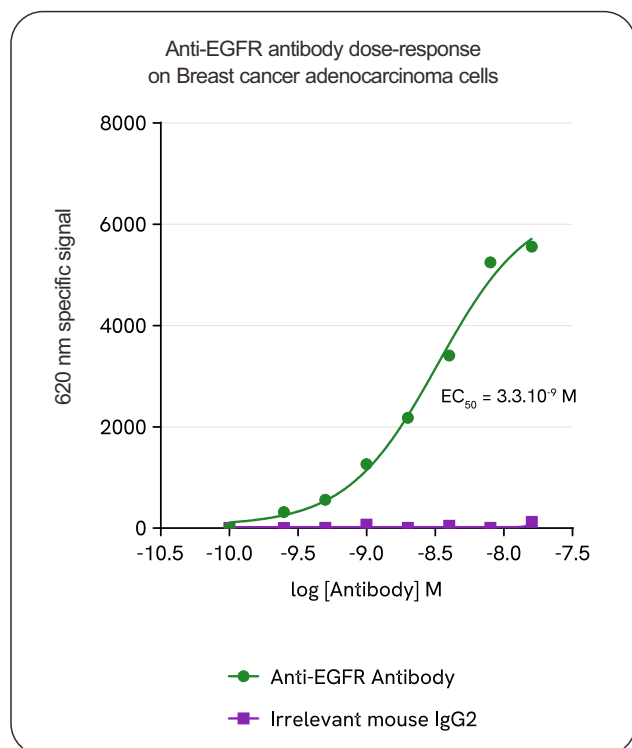


图4: 使用pHSense Fab抗小鼠IgG2监测抗EGFR抗体的内化

结论

pHSense Eu Fab技术为在活细胞中监测抗体和ADCs的内化提供了一种稳健、免洗、基于微孔板的解决方案。通过利用铕标记Fab片段独特的双重pH敏感性和时间分辨荧光（TRF）能力，该检测方法能够以极低的背景干扰实现内化事件的高灵敏度和特异性检测。

实验验证证明了Fab-IgG结合在各种同种型和pH条件下均具有强且稳定的结合力，确认了该检测方法适用于在整个吞途径中追踪内化过程。此外，pHSense Eu Fab试剂成功检测了治疗性抗体和各种类型ADCs的内化（包括曲妥珠单抗及其衍生物Kadcyla[®]和Enhertu[®]以及抗EGFR抗体），也适用于具有不同受体表达水平的细胞系。

这些结果突显了pHSense平台在内化研究中的多功能性和可靠性，不受抗体形式、有效载荷或受体密度的限制。这使其成为研究人员开发和表征基于抗体的治疗药物的宝贵工具，其形式兼容高通量筛选。

产品信息

产品名称	货号(96孔)*
pHSense Eu Fab Anti-Human IgG	81HUEU1AA
pHSense Eu Fab Anti-Mouse IgG2	81MO2EU1AA

*也提供更大包装规格

提示与实用建议

细胞接种密度

对于96孔板中的大多数细胞系，每孔5,000至100,000个细胞的接种密度通常是合适的。但是，最佳密度应根据每种特定细胞类型和应用通过经验确定。

细胞培养基

pHSense Eu Fab检测与标准细胞培养基兼容，包括含血清的培养基。

酶标仪

所有兼容TRF和/或HTRF的酶标仪均与pHSense检测完全兼容。根据酶标仪型号，必须设定特定的仪器设置。

有关Revvity酶标仪的配置，请参阅pHSense设置建议文档。有关其他酶标仪的pHSense设置建议，请联系您当地的技术支持。

上海玮驰仪器有限公司



关注我们



联系我们

上海市浦东新区环科路999弄浦东国际人才港13号楼2楼

☎ 400-820-3556

江苏省南京市雨花台区软件大道109号雨花客厅3幢

☎ 025-83531339

江苏省苏州市工业园区新平街388号21幢5层08单元

☎ 0512-65107980

杭州市钱塘新区2号大街519号佳宝科创中心1号楼

☎ 0571-86630817