

筛选抗体内化：使用 pH 敏感染料的简单基于孔板的检测方法



Nidhi Nath, Becky Godat, Cesear Corona, Chad Zimprich, Mark McDougall, Poncho Meisenheimer, Marjeta Urh
Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Rd, Madison, WI 53711

1. 基本介绍

受体介导的内化是抗体药物偶联物（ADCs）的重要作用机制（MOA）。然而，当前研究抗体内化的方法存在多种局限性：

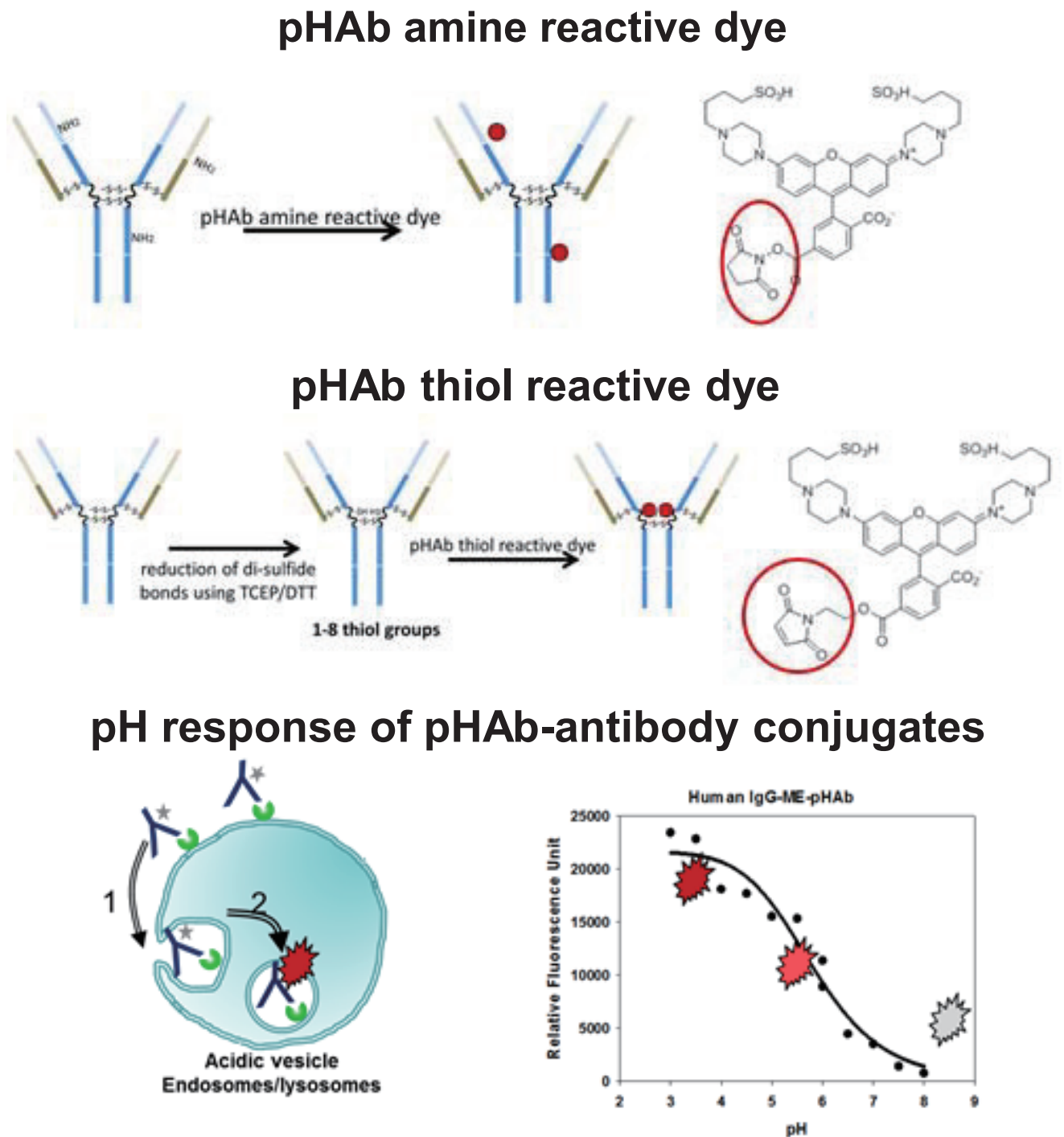
- 1. 多步骤流程不适用于大规模筛选；
- 2. 信噪比低；
- 3. 不适合进行动力学测定。

Promega 已经开发出一种克服传统内化检测实验相关问题的方法。该方法主要包括：

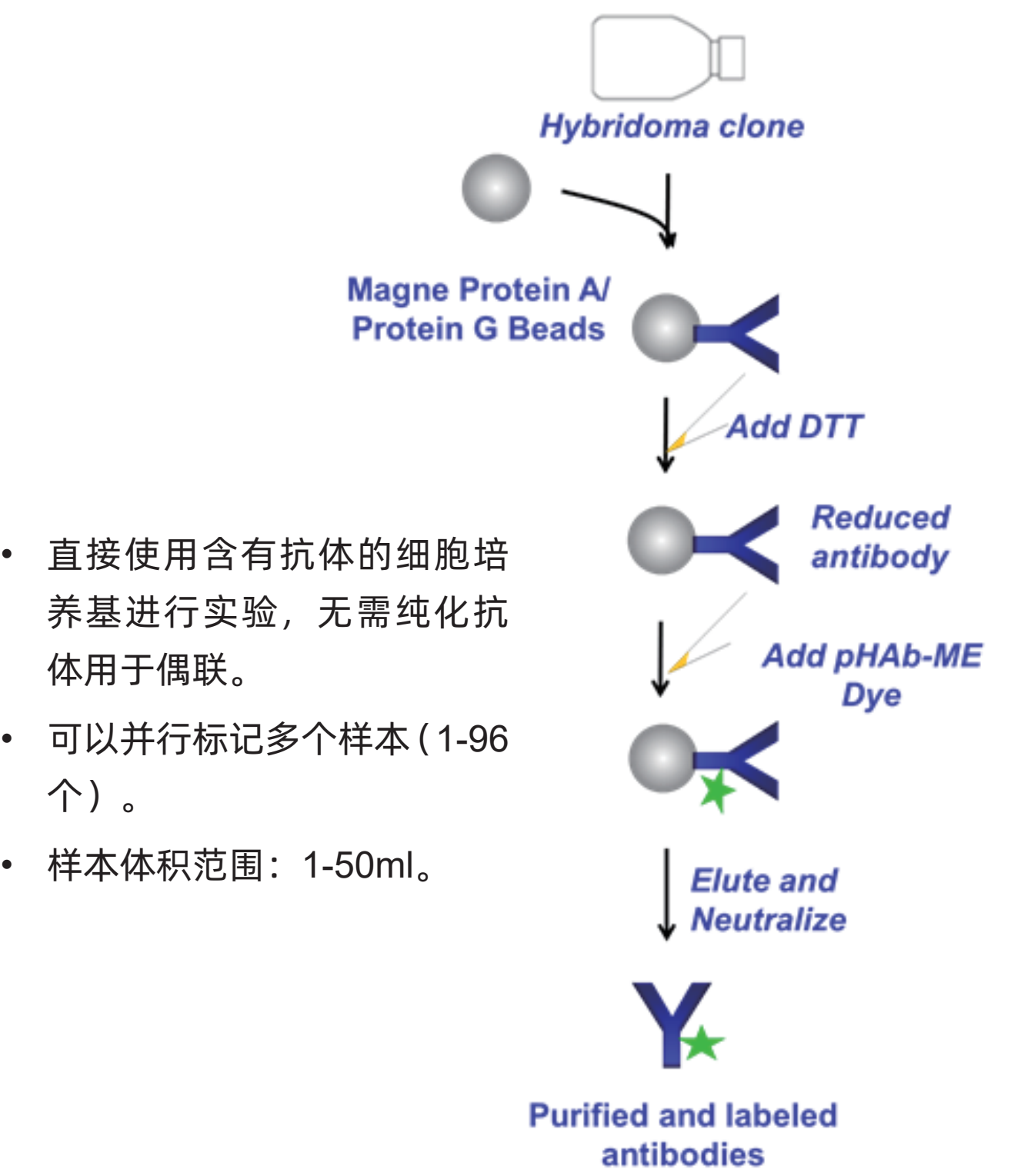
- 1. 使用一种水溶性、亮度高且光稳定性好的 pH 传感器染料（pHAb），用于研究抗体的内化；
- 2. 一种经过优化的方法可以直接从细胞培养基中将 pHAb 染料与抗体偶联；
- 3. 设计了一种 96 孔板为基础的高信噪比检测体系，可用于：
 - (a) 实时监测抗体的内化过程；
 - (b) 对抗体内化能力进行筛选。

2.pH Sensor Dyes (pHAb Dyes)

pHAb 染料具有两种不同的活性基团，分别用于与伯胺或硫醇反应性基团发生反应。



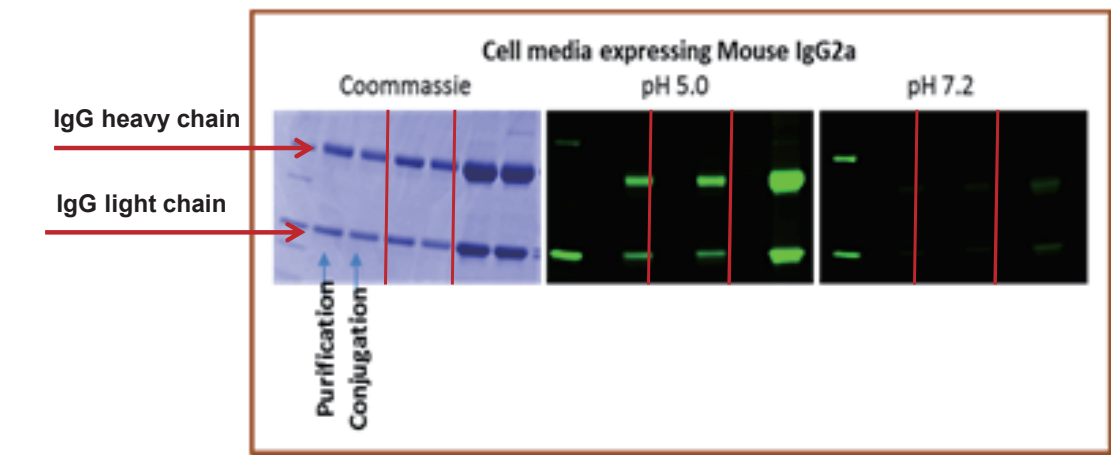
3. 磁珠上抗体 -pHAb 染料偶联



- 直接使用含有抗体的细胞培养基进行实验，无需纯化抗体用于偶联。
- 可以并行标记多个样本（1-96 个）。
- 样本体积范围：1-50ml。

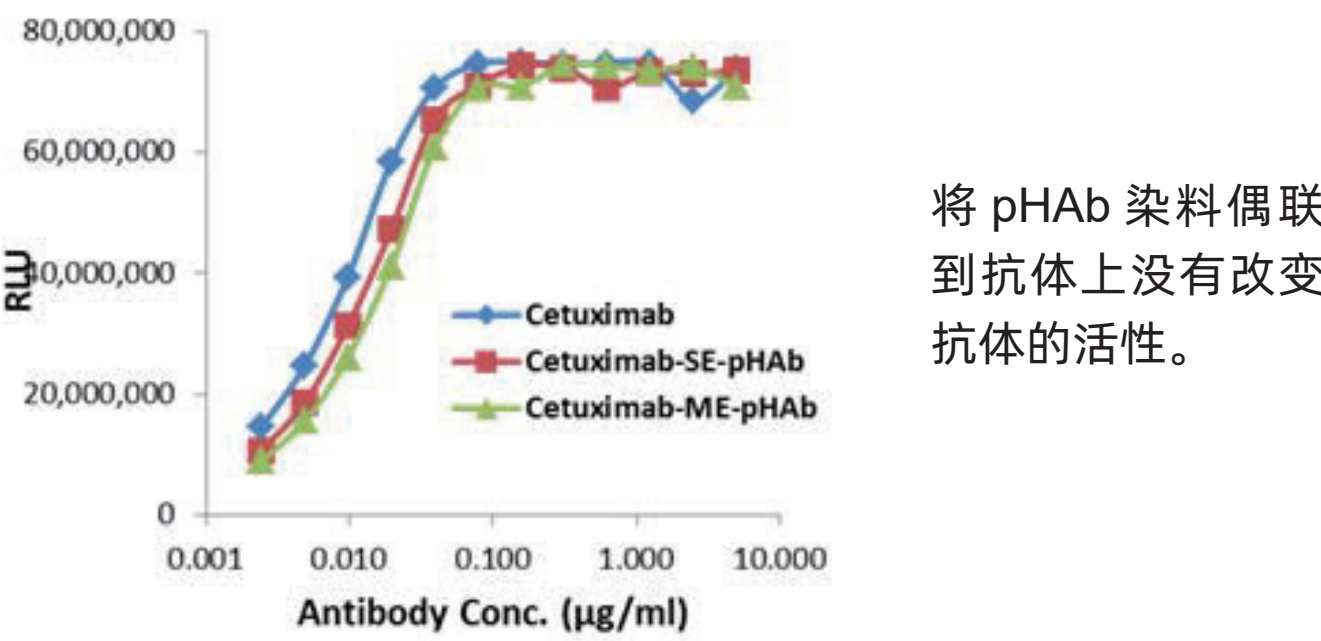
4. 抗体 -pHAb 偶联物的特性表征

通过基于磁珠的方法，直接从细胞培养基中将各种小鼠 IgG2a 样本与 pHAb 染料偶联。



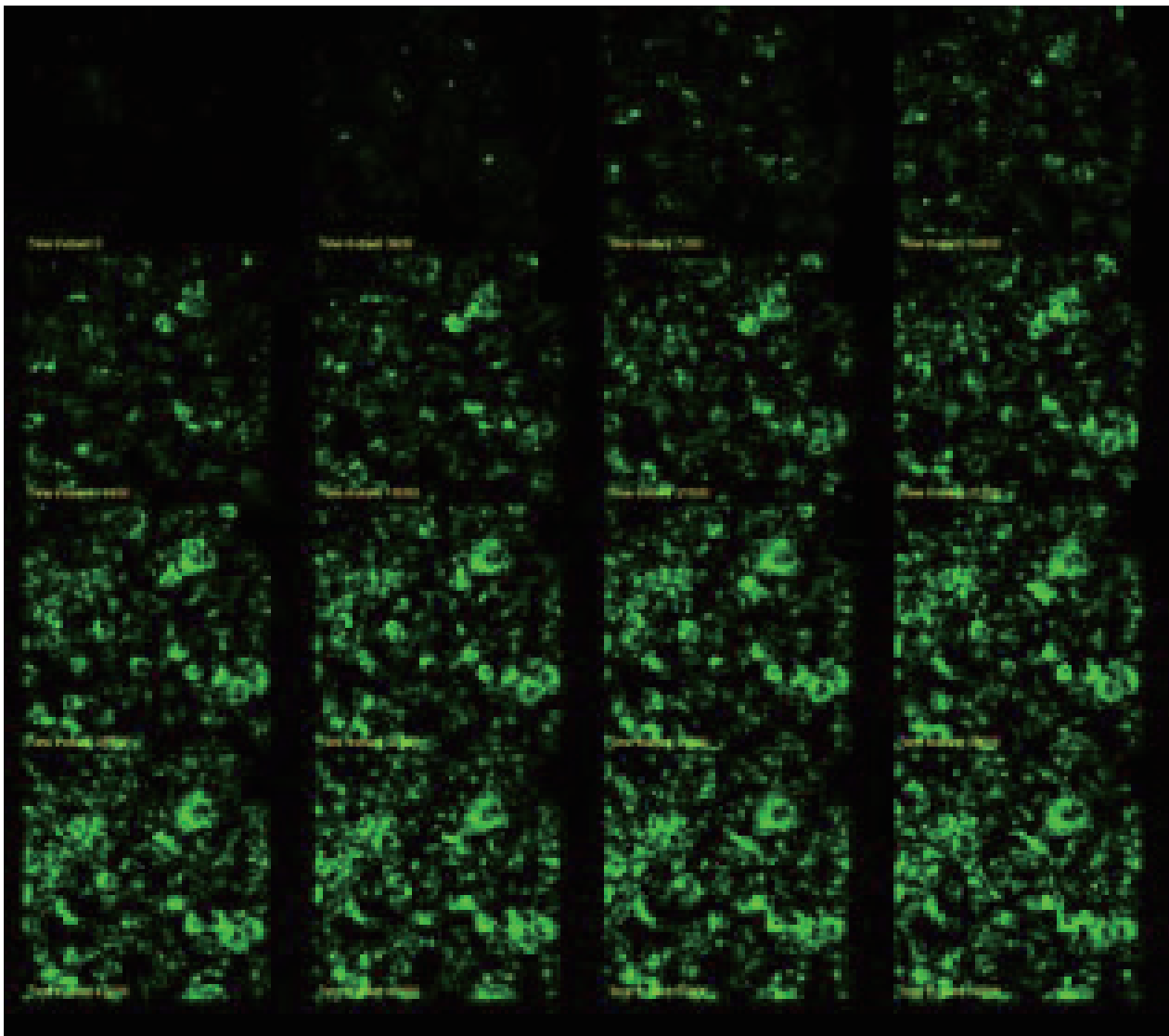
- 染料偶联后高抗体回收率
- 抗体 -pHAb 染料对 pH 变化作出响应

使用 ELISA 测定 Cetuximab 在与 pHAb 染料偶联前后的亲和力。



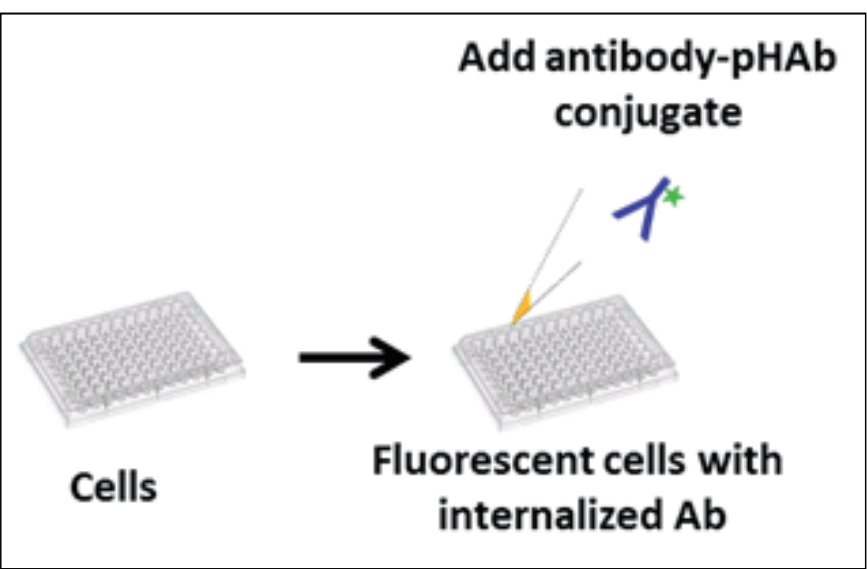
将 pHAb 染料偶联到抗体上没有改变抗体的活性。

5. 实时监测 Trastuzumab-pHAb、偶联物的内化



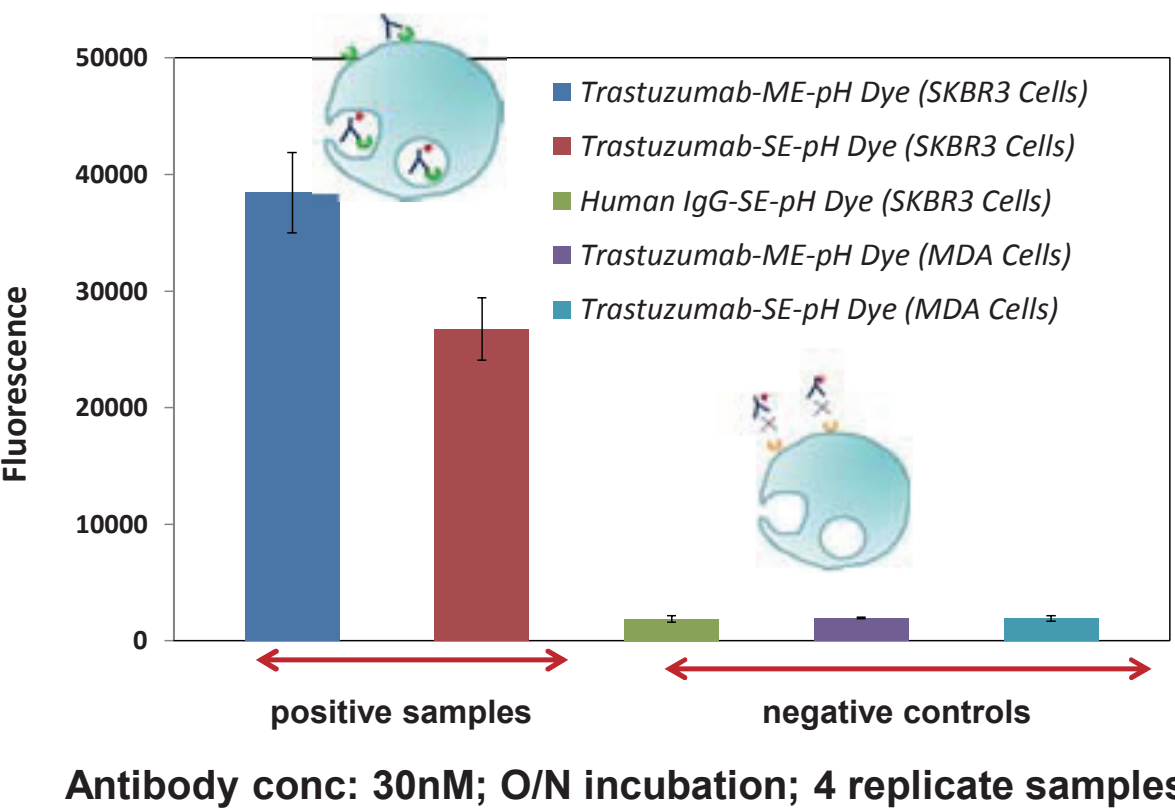
- 将 Trastuzumab (anti-HER2) 与 pHAb 染料进行偶联
- 用 30nM 的 Trastuzumab-pHAb 染料偶联物处理 SKBR3 细胞
- 使用共聚焦显微镜每 60 分钟捕捉一次图像，监测内化过程

6. 明亮的 pHAb 染料能够进行 96 孔板等基于孔板的检测



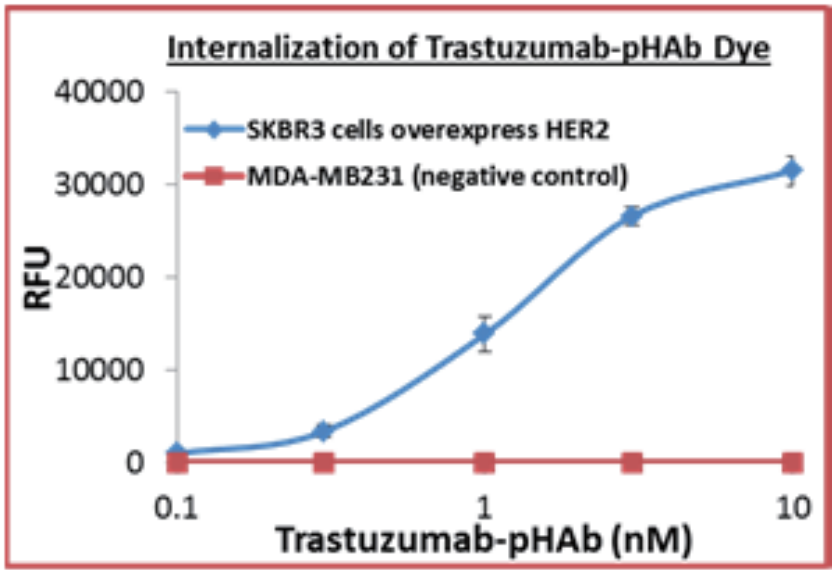
优势

- 简单的实验流程：加入 - 更换培养基 - 读数
- 卓越的信噪比

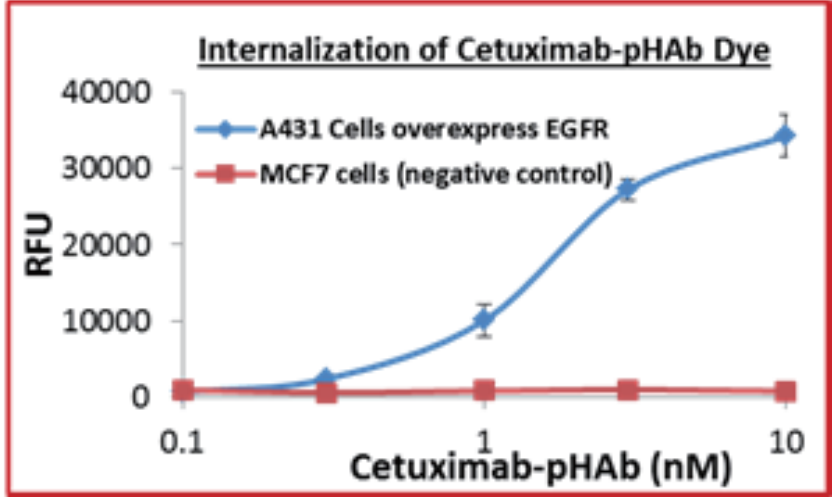


7. 使用基于孔板的检测方法来定量内化作用

抗体浓度的影响



将 Trastuzumab 与 pHAb 染料偶联物的浓度进行梯度稀释后加入到 96 孔板中表达 HER2 的 SKBR3 细胞或 MDA-MB231 细胞（阴性对照）中。孵育 24 小时后，使用荧光读板仪测定内化抗体的荧光。



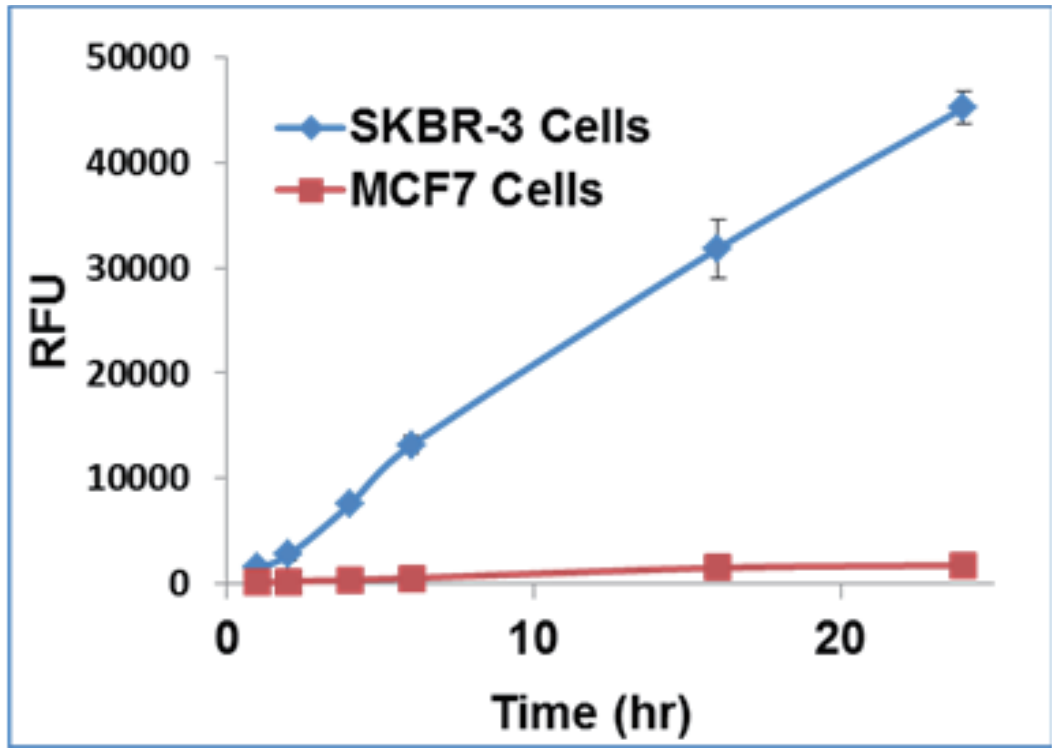
将 Cetuximab 与 pHAb 染料偶联物的浓度进行梯度稀释后加入到 96 孔板中表达 EGFR 的 A431 细胞或 MCF7 细胞（阴性对照）中。经过 24 小时孵育后，如上所述测定了信号。

基于孔板定量的优势：

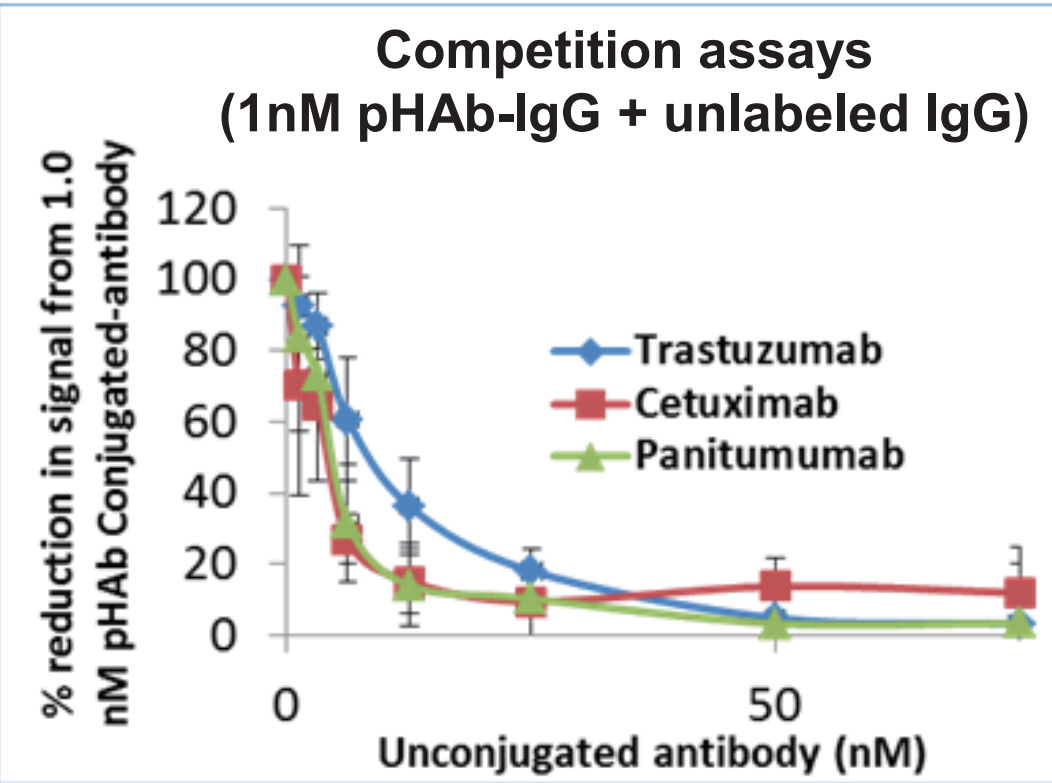
- 易于操作且具有可重复性
- 可以比较多种抗体及其亚型的效力
- 卓越的信噪比

8. 内化速率和竞争检测

Trastuzumab-pHAb 内化速率



Trastuzumab-pHAb 染料偶联物与表达 HER2 的 SKBR3 细胞或 MCF7 细胞（阴性对照）在 96 孔板中共同孵育不同时间。内化作用随时间的变化在 96 孔荧光板读板仪中读取。



竞争测定是通过检测未偶联的抗体对偶联有 pHAb 染料的抗体内化作用的抑制来进行的。

9. 结论

- 一种新的、水溶性、明亮且光稳定的染料，可用于与抗体偶联。适用于与胺或硫醇反应基团反应。
- 一种基于磁珠的偶联方法，可直接从细胞培养基中标记抗体。
- 一种可重复的基于孔板的测定法，可以根据受体介导的内化特性进行抗体的筛选和排序。