

重组抗 CD20 单克隆抗体 ELISA 检测新方法的建立

刘若瑞, 陈知航, 许先兴, 孙丽丽, 刘运龙, 程远国

军事医学科学院 微生物流行病学研究所, 北京 100071

[摘要] 目的:建立一种检测重组抗 CD20 单克隆抗体的新的 ELISA 方法,以便快捷、简便、灵敏地检测生物体液中的重组抗 CD20 单抗。方法:采用双抗夹心 ELISA 法对重组抗 CD20 单克隆抗体进行定量检测,包被抗体用猴血清吸附的羊抗人 IgG,检测抗体用猴血清吸附的羊抗人 IgG-HRP,最后加底物显色剂,终止后在酶标仪 450 nm 下读数。结果:按照新药临床前药代动力学中方法学确认的要求进行验证,获得了检测重组抗 CD20 单克隆抗体的高灵敏度和稳定的 ELISA 方法。结论:该 ELISA 方法简便、稳定、灵敏度高,可用于重组抗 CD20 单克隆抗体的检测。

[关键词] 酶联免疫吸附测定;重组抗 CD20 单克隆抗体;药代动力学

[中图分类号] R392.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-0002(2011)02-0220-05

Development of Original Enzyme Linked Immunosorbent Assay Method for Detection of rh-anti-CD20ximab

LIU Ruo-Rui, CHEN Zhi-Hang, XU Xian-Xing, SUN Li-Li, LIU Yun-Long, CHENG Yuan-Guo

Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

[Abstract] **Objective:** To establish a rapid, sensitive and specific enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method for detection of rh-anti-CD20ximab. **Methods:** This assay employed the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. The assay method utilized sheep anti-human IgG that had been adsorbed against cynomolgus monkey serum for capture as well as detection of rh-anti-CD20ximab. Finally, a substrate solution was added to the wells and color develops in proportion to the amount of rh-anti-CD20ximab. The color development was stopped with stop solution, then read at 450 nm using a microplate reader. **Results:** A rapid, sensitive and specific ELISA method for detection of rh-anti-CD20ximab was established according to requirement of method validation in new drugs preclinical pharmacokinetics. **Conclusion:** The ELISA method is rapid, stable and high sensitivity for the detection of rh-anti-CD20ximab.

[Key words] enzyme linked immunosorbent assay; rh-anti-CD20ximab; pharmacokinetics

非何杰金淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma, NHL)是最常见的淋巴系统恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率已居恶性肿瘤第 5 位,大多数 NHL 起源于 B 淋巴细胞。研究发现,CD20 抗原是一种疏水性跨膜蛋白,相对分子质量约为 35×10^3 ,位于前 B 淋巴细胞(pre-B cell)和成熟 B 淋巴细胞上,也表达于 90% 以上的 NHL 的 B 淋巴细胞上^[1-4],在造血干细胞、原 B 淋巴细胞(pro-B cell)、正常浆细胞或其他正常组织中未发现表达。CD20 抗原调节细胞周期起始和分化,而且可能起到如同钙离子通道的功能。CD20 不从细胞表面脱落,且与抗体结合后不内化,因此可以选择 CD20 作为靶位点与抗体结合来治疗淋巴瘤^[5-6]。Rituximab(美罗华)是第一个获准用于治疗 NHL 的单抗产品。它是一种以基因工程技术

研制的部分可变区(V 区)为鼠源、其他部分为人源的高纯度针对 CD20 抗原的人鼠嵌合型单克隆抗体,其临床应用效果显著。Rituximab 的相对分子质量约为 145×10^3 ,由 2 条包含 451 个氨基酸残基的重链及 2 条包含 213 个氨基酸残基的轻链组成。Rituximab 包括 2 个结构区,即 Fab 结构区和 Fc 结构区。Fab 结构区与 B 淋巴细胞上的 CD20 抗原结合,结合的亲和力约为 8.0 nmol/L,而 Fc 结构区免疫效应器介导 B 淋巴细胞的溶解。目前报道的 Rituximab 使 B 淋巴瘤细胞溶解的作用机制主要有:补体依赖的细胞毒性(complement-dependent cyto-

[收稿日期] 2010-10-26

[作者简介] 刘若瑞(1984-),男,硕士研究生

[通信作者] 程远国, (E-mail)chengyg@nic.bmi.ac.cn

toxicity, CDC)、抗体依赖的细胞毒性(antibody-dependent cytotoxicity, ADCC)及 Rituximab 的直接作用(包括阻断细胞周期、抑制 DNA 合成、转移磷脂酰丝氨酸至膜外、激活丝/苏氨酸蛋白酪氨酸激酶、引起细胞内 Ca^{2+} 的流出、诱导凋亡、下调抗凋亡蛋白的表达量等)^[7-12]。

在 Rituximab 的早期研究中,在猴中进行了 POC(概念验证)研究,用于评价药物分子的安全性、PK(药代动力学)和 PD(药效学)。目前已报道的检测分析方法多数为酶联免疫吸附测定(ELISA),其他方法还有流式细胞测定法等。但这些方法的灵敏度都不是很高,ELISA 的 LOQ(定量限)为 0.5~6.6 $\mu\text{g/mL}$,流式细胞法的 LOQ 为 0.1~1 $\mu\text{g/mL}$ ^[13],需要建立一种高灵敏的生物分析法,能够精确地测定猴血清中 Rituximab 的浓度。因此,我们研究了一种生物分析 PK 测定法。此方法使用了不依赖 Rituximab 的特异性试剂,一抗与二抗都为羊抗人 IgG,此多抗是被特殊处理过的(猴血清吸附过),既可捕获又可用于检测 Rituximab,这样可以除去与猴 IgG 结合的羊抗人 IgG。这种测定方法有非常高的灵敏度、准确性和特异性,并可成功地用于支持 Rituximab 猴试验研究的 PK 分析。

1 材料和方法

1.1 材料

重组抗 CD20 单克隆抗体 Rituximab (10 mg/mL)、牛血清白蛋白(BSA)购于 Roche 公司;猴血清吸附的羊抗人 IgG (1 mg/mL)、猴血清吸附的羊抗人 IgG-HRP (1 mg/mL) 购于 BETHYL 公司;Proclin300 购于 Supelco Analytical 公司;四甲基联苯胺(TMB)购于上海晶纯试剂有限公司;聚苯乙烯 96 孔酶标板购于 Costar 公司;酶标仪购于 Bio-RAD 公司;其他常规试剂为国产分析纯产品。

1.2 试剂配制

pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS):16 g NaCl,0.4023 g KCl,2.84 g Na_2HPO_4 ,0.544 g KH_2PO_4 ,溶解于 2 L ddH₂O。

包被液:取 0.2 mol/L 碳酸钠水溶液 16 mL 和 0.2 mol/L 碳酸氢钠水溶液 34 mL,加蒸馏水至 200 mL。

封闭液:PBS,2% BSA,0.05% P20,0.05% Proclin300,0.25% CHAPS,5 mmol/L EDTA,0.35 mol/L NaCl,pH8.0,总体积 200 mL。

稀释液:PBS,0.5% BSA,0.05% P20,0.05%

Proclin300,0.25% CHAPS,5 mmol/L EDTA,0.35 mol/L NaCl,pH8.9,总体积 200 mL。

TMB 溶液:将 A 液与 B 液等体积混和,现用现配。

终止液:将 7 mL 磷酸(85%)缓慢加入 93 mL 蒸馏水中,边加入边搅拌。

ELISA 洗板液:将 0.5 mL Tween-20 加入 999.5 mL 磷酸盐缓冲液中。

标准曲线溶液:先将重组抗 CD20 单克隆抗体稀释到 400 ng/mL,之后再对倍系列稀释至 6.25 ng/mL。

1.3 检测步骤

用 pH9.6 的碳酸-重碳酸盐缓冲液稀释一抗(猴血清吸附的羊抗人 IgG,5 $\mu\text{g}/\text{孔}$)后包被 96 孔板,4℃过夜;洗板 3 次,拍干,加封闭液 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$,室温封闭 2 h;洗板 3 次,拍干,用含 10%空白猴血清的稀释液稀释不同浓度的标准品和待测样品,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,室温孵育 1 h;洗板 6 次,拍干,加二抗(猴血清吸附的羊抗人 IgG-HRP 1:10 000)100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,室温孵育 1 h;洗板 6 次,拍干,加 TMB 显色液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,室温孵育 15 min;加终止液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,测定 $D_{450\text{nm}}$ 值。

2 结果

2.1 标准曲线与线性范围

重组抗 CD20 单克隆抗体在 6.25~400 ng/mL 范围内,蛋白浓度(ng/mL)的对数值与免疫反应光吸收值(D 值)呈 S 形曲线,经四参数 Logistic 函数曲线模型拟合,求得曲线斜率、 EC_{50} 值及上下端渐进线间的近线性范围。其数学模型如下,拟合曲线见表 1 和图 1。

$$y = \frac{(A_1 - A_2)}{[1 + (x/x_0)^p]} + A_2$$

2.2 方法的特异性

按照制备标准曲线的方法制成 25 ng/mL 的重组抗 CD20 单克隆抗体的样品,并使其中含有 25 ng/mL 的 PEG-EPO、IL-8、IFN- α 2b 和 G-CSF,进行交叉反应试验。结果见表 2,重组抗 CD20 单克隆抗体与 PEG-EPO、IL-8、IFN- α 2b 和 G-CSF 没有发生交叉反应,测定结果没有受到影响。

2.3 方法的回收率

按照制备标准曲线的方法制成 200、50 和 12.5 ng/mL(高、中、低)等 3 个浓度的重组抗 CD20 单克隆抗体质控样品,按前述方法进行测定,重复 5 次,

由同一板上的标准曲线回归方程计算出的浓度为重组抗 CD20 单克隆抗体的检出量。结果见表 3,3 个浓度质控样品的回收率为 95.8%~105.3%, 变异系数为 1.3%~2.3%, 符合方法学确认的要求。

2.4 方法的精密度

按照制备标准曲线的方法制成 200、50 和 12.5 ng/mL(高、中、低)等 3 个浓度的重组抗 CD20 单克隆抗体质控样品,按前述方法进行测定,重复 5 次,由同一板上的标准曲线回归方程计算出的浓度为重组抗 CD20 单克隆抗体的检出量。

板内差异:1 块板内每个浓度重复测定 5 次,结

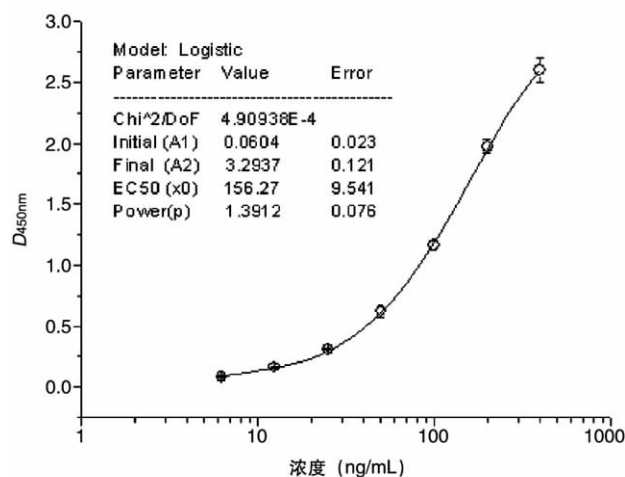


图1 重组抗 CD20 单克隆抗体的四参数校正曲线

表1 标准曲线与线性范围

理论浓度 (ng/mL)	D_1	D_2	平均值	标准差
400	2.808	2.65	2.599	0.105
200	2.146	2.056	1.971	0.057
100	1.327	1.268	1.167	0.035
50	0.721	0.772	0.616	0.042
25	0.44	0.436	0.308	0.004
12.5	0.292	0.291	0.161	0.006
6.25	0.212	0.21	0.081	0.005
0	0.135	0.126	0	0

表2 重组抗 CD20 单克隆抗体加入 PEG-EPO、IL-8、IFN- α 2b 和 G-CSF 后的回收率 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

理论值 (25 ng/mL)	检测值 (ng/mL)	回收率 (%)	变异系数 (%)
PEG-EPO	26.0 \pm 1.1	103.9 \pm 4.4	4.3
IL-8	26.2 \pm 1.9	105.0 \pm 7.5	7.1
IFN- α 2b	25.3 \pm 0.7	101.0 \pm 2.6	2.6
G-CSF	27.1 \pm 0.6	108.3 \pm 2.3	2.2

表3 ELISA 方法检测加入猴血清中重组抗 CD20 单克隆抗体的回收率 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

理论值 (ng/mL)	检测值 (ng/mL)	回收率 (%)	变异系数 (%)
200	195.6 \pm 3.9	97.8 \pm 2.0	2.0
50	52.0 \pm 0.7	103.9 \pm 1.4	1.3
12.5	12.4 \pm 0.3	99.1 \pm 2.3	2.3

果见表 4。板间差异:3 块板各测定一次,结果见表 5。

结果表明,用本实验室建立的 ELISA 方法测定血清样品中重组抗 CD20 单克隆抗体,在 6.25~400 ng/mL 浓度范围内,板内精密度的变异系数为 1.2%~7.0%,测定的板间重现性良好,板间精密度的变异系数为 4.5%~6.2%。板间与板内精密度均符合方法学确认中对精密度的要求。

2.5 方法的定量下限(LLOQ)

按照制备标准曲线的方法制成 6.25 ng/mL 的重组抗 CD20 单克隆抗体,按前述方法进行测定,重复 5 次,由同一板上的标准曲线回归方程计算出的浓度为重组抗 CD20 单克隆抗体的检出量。结果见表 6, LLOQ 的准确度为 85.6%~103.4%, 变异系数为 8.45%, 符合方法学确认中对 LLOQ 的要求。

2.6 样品的稳定性

2.6.1 样品的冻融稳定性 从标准曲线选取高、中、低 3 个浓度的质控样品,每个浓度 5 个样本,在 -20℃ 冰箱中冷冻后取出,室温融化,测定其浓度(表 7)和室温保持 4 h 后的稳定性(表 8)。因为本研究设计要求,所有须测定样品多管冻存,每个样品只能冻融 1 次,且必须在 4 h 内加样完毕,因此本研究只进行冻融 1 次及在室温保持 4 h 的稳定性研究。

结果表明,样品冻融稳定性试验的相对准确度为 -15.1%~-4.8%, 变异系数为 4.0%~7.8%, 符合药

表4 ELISA 方法检测加入猴血清中重组抗 CD20 单克隆抗体的板内精密度 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

理论值 (ng/mL)	检测值 (ng/mL)	回收率 (%)	变异系数 (%)
200	199.2 \pm 14.0	99.6 \pm 7.0	7.0
50	48.7 \pm 1.7	97.3 \pm 3.3	3.4
12.5	13.5 \pm 0.2	107.8 \pm 1.3	1.2

表5 ELISA 方法检测加入猴血清中重组抗 CD20 单克隆抗体的板间精密度 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

理论值 (ng/mL)	检测值 (ng/mL)	回收率 (%)	变异系数 (%)
200	195.1 \pm 12.2	97.6 \pm 6.1	6.2
50	50.7 \pm 2.3	101.4 \pm 4.5	4.5
12.5	12.8 \pm 0.8	102.5 \pm 6.0	5.9

表6 ELISA 方法检测加入猴血清中重组抗 CD20 单克隆抗体的 LLOQ ($\bar{x} \pm s, n=5$)

理论值 (ng/mL)	检测值 (ng/mL)	准确度 (%)	平均准确度 (%)	变异系数 (%)
	6.17	98.7		
	6.46	103.4		
6.25	5.80	92.8	93.2	8.45
	5.35	85.6		
	5.35	85.6		

代动力学的要求;样品室温 4 h 稳定性试验的相对准确度为-3.5%~4.2%, 变异系数为 0.6%~7.0%,符合药代动力学的要求。

2.6.2 样品的长期稳定性 从标准曲线选取高、中、低 3 个浓度的质控样品, 每个浓度 5 个样本, 在-20℃冰箱中放置,30、60 d 取样,室温融化,测定其浓度。结果见表 9 和表 10。样品 30 d 长期稳定性试验的相对准确度为-15.4%~-9.0%, 变异系数为 3.6%~9.9%;样品 60 d 长期稳定性试验的相对准确度为-19.8%~-16.5%,变异系数为 2.6%~5.9%。

2.7 样品稀释率的影响

将重组抗 CD20 单克隆抗体配制成 80 μg/mL, 将其进行 1/500、1/1000、1/2000 和 1/4000 稀释, 每个稀释率 4 个样品,测定结果见表 11。样品稀释率影响的试验相对准确度为-9.6%~-3.8%, 变异系数为 1.2%~8.0%,符合药代动力学的要求。

综上所述,经过方法学确证,该方法的标准曲线、特异性、板内和板间精密度、LLOQ、回收率、稳定性及样品稀释率的影响均满足重组抗 CD20 单克隆抗体的药代动力学研究的要求。

表 7 冻融稳定性($\bar{x}\pm s, n=5$)

理论值(ng/mL)	检测值(ng/mL)	准确度(%)	变异系数(%)
200	169.7±8.3	84.9±4.1	4.9
50	47.6±1.9	95.2±3.8	4.0
12.5	11.0±0.9	87.8±7.0	7.8

表 8 室温 4 h 稳定性($\bar{x}\pm s, n=5$)

理论值(ng/mL)	检测值(ng/mL)	准确度(%)	变异系数(%)
200	199.1±14.0	99.5±7.0	7.0
50	48.3±1.9	96.5±3.7	3.8
12.5	13.0±0.1	104.2±0.7	0.6

表 9 30 d 长期稳定性($\bar{x}\pm s, n=5$)

理论值(ng/mL)	检测值(ng/mL)	准确度(%)	变异系数(%)
200	169.2±8.8	84.6±4.4	5.2
50	45.5±1.6	91.0±3.2	3.6
12.5	10.8±1.1	86.6±8.6	9.9

3 讨论

免疫分析方法是检测生物样本中蛋白药物的常用方法,主要包括 ELISA、放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)及荧光免疫分析等,其分子基础是抗原抗体间的特异性结合。此类分析方法可以快速、大批量地检测生物样本,缺点是可能受到结合蛋白、代谢物、抗体及基质等方面的干扰。因此,一般蛋白药物 PK 测定都需要特异性的试剂。

表 10 60 d 长期稳定性($\bar{x}\pm s, n=5$)

理论值(ng/mL)	检测值(ng/mL)	准确度(%)	变异系数(%)
200	160.4±9.4	80.2±4.7	5.9
50	41.8±1.3	83.5±2.5	3.0
12.5	10.4±0.3	83.5±2.0	2.6

表 11 样品稀释率的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

稀释率	检测值(ng/mL)	准确度(%)	变异系数(%)
1/500	72.5±1.8	90.6±2.3	2.5
1/1000	76.9±0.9	96.2±1.2	1.2
1/2000	72.3±5.8	90.4±7.2	8.0
1/4000	76.0±1.3	95.0±1.6	1.7

一般地,用于测定血清中目标分子浓度的 PK 测定法,需要一种或多种针对目标分子的专属试剂。由于血清中基质成分与分析试剂的非特异性相互作用,生物基质往往引起很高的本底。Rituximab 是一种人源化的 IgG, 人 IgG 与猴 IgG 有很高的序列同一性, 在 Rituximab 和猴 IgG 的重链序列排序中显示,氨基酸序列同一性为 80%,序列相似性达 85%^[14]。此外,猕猴 IgG 的生理正常流通水平为 10~16 mg/mL^[15],这一水平大大高出了已确定的 Rituximab 的治疗浓度, 因此对 Rituximab 在猕猴体内的代谢研究有很大的困难。为此,我们需要一种高灵敏的生物分析法,能够精确地测定猴血清中 Rituximab 的浓度。如果没有特异性的捕获抗体和检测抗体,那么猴 IgG 必然会与 Rituximab 发生交叉反应,且本底值会很高,灵敏度很低,这是以前 ELISA 灵敏度不高的原因。

基于以上因素,我们研究了一种生物分析 PK 测定法,使用不依赖 Rituximab 的特异性试剂,一抗与二抗都是羊抗人 IgG, 此多抗既可捕获又可用于检测 Rituximab,且此多抗是被猴血清吸附过,这样便尽可能排除了猴血清成分的干扰。这种测定方法有非常高的灵敏性、准确性和特异性,并可成功地用于支持 Rituximab 猴试验研究的 PK 分析。值得注意的是,预实验中发现个别猕猴由于天然或病理条件可出现高免疫球蛋白血症, 从而对 Rituximab 的测定有一定程度的干扰,所以实验前需要对空白猕猴血清进行筛选,剔除高免疫球蛋白血症个体,以免干扰后续测定。正因为此分析试剂是以人 IgG 为特异性的,而不仅仅是以 Rituximab 为特异性的,所以此方法有更广泛的应用性,同时也可用于定量检测在非人灵长类和啮齿类动物血清中其他的人 IgG 或人源化 IgG 分子, 如 Cetuximab (西妥昔单抗)、Trastuzumab (曲妥珠单抗)、Bevacizumab (贝伐单抗)等^[16]。但是,当动物给予多种人源化的单抗时,此方

法只能给出体内总的单抗水平,无法给出单一单抗的水平。

总之,用此方法我们可以检测猕猴血清中人源化 IgG,而无需特异性的试剂。我们也可扩大其用途,用于检测其他的人化或人源化的抗体浓度,并可评价体内总体生物治疗水平。

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008,58(2):71-96.
- [2] 温新宇. 抗人 CD20 单克隆抗体治疗 B 细胞淋巴瘤研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2001,9(4):376-379.
- [3] Pescovitz M D. Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: history and mechanism of action [J]. Am J Transplantation, 2006,6:859-866.
- [4] 师明磊, 胡显文. Rituximab 的作用机理与抗药机理[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004,11(4):302-304.
- [5] Multani P S, Grossbard M L. Monoclonal antibody-based therapies for hematologic malignancies[J]. J Clin Oncol, 1998,16(11): 3691-3710.
- [6] Kunala S, Macklis R M. Ionizing radiation induces CD20 surface expression on human B cells[J]. Int J Cancer, 2002,96(3): 178-181.
- [7] Johnson P, Glennie M. The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells[J]. Semin Oncol, 2003,30(1 Suppl 2):3-8.
- [8] Clynes R A, Towers T L, Presta L G, et al. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets [J]. Nat Med, 2000,6:443-446.
- [9] Flieger D, Renoth S, Beier I, et al. Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C288 in CD20-expressing lymphoma cell lines[J]. Cell Immu, 2000,204:55-63.
- [10] Beurskens F J, Ruuls S R, Engelberts P J. CD20 monoclonal antibodies complement activation impacts B-cell depletion by both type I and type II[J]. Blood, 2008,112:4354-4355.
- [11] Manches O, Lui G, Chaperot L, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas [J]. Blood, 2003,101:949-954.
- [12] Glennie M J, French R R, Cragg M S, et al. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies [J]. Mol Immunol, 2007,44:3823-3837.
- [13] Cartron G, Blasco H, Piantaud G, et al. Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: Thought for the best use[J]. Crit Rev Oncol/Hematol, 2007,62:43-52.
- [14] Lewis A P, Barber K A, Cooper H J, et al. Cloning and sequence analysis of kappa and gamma cynomolgus monkey immunoglobulin cDNAs[J]. Dev Comp Immunol, 1993,61:549.
- [15] Biagini R E, Moorman W J, Lal J B, et al. Normal serum IgE and IgG antibody levels in adult male cynomolgus monkeys [J]. Lab Anim Sci, 1988,38:194.
- [16] Yang Jihong, Ng C, Lowman H, et al. Quantitative determination of humanized monoclonal antibody rhuMab2H7 in cynomolgus monkey serum using a generic immunoglobulin pharmacokinetic assay[J]. J Immunol Methods, 2008,335:8-20.