

对用于包被冠状动脉支架的抗 CD34 单克隆抗体的生物学指标的质量控制研究

张峰¹, 郭玮¹, 余占江², 王佑春^{1*}

(1. 中国药品生物制品检定所细胞室, 北京 100050 2 乐普(北京)医疗器械股份有限公司, 北京 102200)

摘要 目的: 对鼠源抗 CD34 单克隆抗体的结合活性以及包被在冠状动脉支架上的抗体量和牢固度等技术指标进行评价。方法: 采用流式细胞术测定抗 CD34 单克隆抗体结合 KG-1a 细胞的活性; 酶联免疫显色方法测定支架上抗体包被量; 体外模拟冲刷方法测定支架上抗体牢固度; 采用显微镜计数方法测定包被抗 CD34 抗体支架体外捕获 CD34(+) 细胞的能力。结果: 在抗 CD34 McAb 浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞平均阳性率为 96.34%; 支架上抗体含量为 $50.97 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$, 而且体外模拟冲刷后支架上抗体含量无显著变化; 包被抗 CD34 单抗的冠状动脉支架捕获细胞数为 $4 \text{ 万个} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。结论: 该方法可用于体外检测抗 CD34 单克隆抗体包被冠状动脉支架的生物学参数。

关键词: 单克隆抗体; 支架; CD34 质量控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)05-0862-05

Quality control of anti-CD34 monoclonal antibody used for coating coronary stents

ZHANG Feng¹, GUO Wei¹, YU Zhan-jiang², WANG You-chun^{1*}

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical & Biological Products, Beijing 100050, China

2 Beijing LePu Medical Apparatus Inc., Beijing 102200, China)

Abstract Objective To evaluate the biological parameters of anti-CD34 monoclonal antibody (McAb) used for coating coronary stents **Methods** KG-1a cell binding activity of anti-CD34 McAb was evaluated with flow cytometric methods. Coated quantity of McAb on coronary stents was measured with ELISA; The binding firmness of McAb was evaluated with wash simulation method. The CD34(+) KG-1a cell capture ability of anti-CD34 McAb coated on coronary stents was measured with microscope counting method **Results** When KG-1a cell was treated with $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ anti-CD34 McAb, the FIFC positive ratio of KG-1a cell was 96.34%; the content of McAb in coronary stent was $50.97 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$; the content of McAb in coronary stent did not change significantly when the wash simulation treatment was applied; the coronary stents coated with anti-CD34 McAb could capture 4×10^4 KG-1a cells each square centimeter **Conclusion** The methods employed above can efficiently evaluate the biological parameters of anti-CD34 McAb used for coating coronary stent

Key words monoclonal antibody; stent; CD34 quality control

血管腔内放置支架是治疗冠状动脉硬化性心脏病的主要手段之一, 传统的金属裸支架通过物理学方法扩张狭窄的冠状动脉, 但术后再狭窄的发病率非常高, 据统计 1 年内的再狭窄的发生率可达 20%。目前冠脉支架的一个重要发展方向是在金属裸支架表面喷涂缓释药物(如喷涂雷帕霉素)抑制平滑肌细胞增生, 从而降低支架内再狭窄的发生, 或

偶联生物学活性分子(如偶联抗 CD34 抗体, 用以捕获内皮祖细胞)赋予支架以生物学活性, 抑制血栓形成, 促进受损血管的再内皮化^[1,2]。内皮祖细胞表面能够相对特异地表达 CD34 分子, 在 1997 年 Asahara 等就在体外成功地将 CD34(+) 细胞诱导分化成内皮细胞, 并且证明了其血管生成能力^[3]。实验室研究结果表明, 与传统支架相比, 使用抗

* 通讯作者 Tel: (010) 67095415 E-mail: Wangyc@nicpbp.org.cn

CD34抗体包被的冠脉支架在放置后由于可以加速狭窄处的再内皮化,其术后再狭窄的发生率和严重程度降低,尤其是支架晚期血栓发生率极低^[4,5]。目前国外Oribus公司生产的抗CD34抗体包被冠状动脉支架已在欧洲和东南亚在内的70多个国家和地区销售,其有效性和安全性已通过HEALING系列临床得到证实^[6],国内乐普公司生产的同类型支架也已进入申报阶段。现对该类制品中抗体的生物学质量参数进行质控研究。

1 材料

鼠源抗CD34单克隆抗体、金属裸支架和鼠源抗CD34单克隆抗体包被支架由乐普公司提供;鼠抗CD34抗体阳性对照购自Biolegend公司;鼠IgG1同型对照抗体购自BD Pharmingen公司;HRP标记羊抗鼠IgG抗体购自中杉金桥公司;KG-1a细胞由本室保存;4,6-二脒基-2-苯吡啶盐酸(DAPI)购自Sigma公司;FITC标记羊抗鼠IgG抗体购自BD公司;样品稀释液为含1% BSA的磷酸盐缓冲液(Na_2HPO_4 8.4 mmol·L⁻¹, NaH_2PO_4 1.9 mmol·L⁻¹, NaCl 150 mmol·L⁻¹, pH 7.4);洗涤缓冲液为含0.1% Tween 20的磷酸盐缓冲液。

2 方法

2.1 流式细胞术检测抗CD34单克隆抗体体外结合KG-1a细胞的能力 KG-1a细胞重悬于样品稀释液中,调整浓度为 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将样品稀释液、鼠抗CD34阳性对照抗体(终浓度 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、待测抗体(终浓度 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、鼠IgG2a同型对照(终浓度 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)分别加入到100 μL KG-1a细胞悬液中,并用样品稀释液将终体积调整至200 μL。冰浴30 min后,使用样品稀释液洗涤细胞2次。第2次洗涤结束后,加入1:10稀释的FITC标记羊抗鼠IgG抗体50 μL重悬细胞,冰浴避光孵育30 min后,洗涤细胞2次。第2次洗涤结束后,用1 mL样品稀释液重悬细胞,上机检测。

2.2 支架上抗体含量测定

2.2.1 标准曲线制备 用磷酸盐缓冲液将待测抗CD34抗体稀释至200Q 100Q 20Q 10Q 4Q 2Q 13.3 10, 4 2 1 ng·mL⁻¹,微孔板中加入各浓度抗体100 μL,每个浓度平行包被3孔,4℃过夜。次日用洗涤缓冲液洗板3次,使用每孔200 μL样品稀释液,37℃封闭1 h,洗涤缓冲液洗板3次。加入1:1000稀释的酶标二抗(HRP标记羊抗鼠IgG抗体)100 μL,37℃孵育30 min后,洗涤缓冲液洗板3次,各反应孔中加入TMB底物溶液100 μL,37℃显色20 min加入2

mol·L⁻¹硫酸100 μL终止显色。测定各孔吸光度值并以4参数模式绘制标准曲线。

2.2.2 支架上抗体含量检测 裸支架和抗体支架样品放置于1.5 mL离心管中,加入样品稀释液1 mL,37℃封闭1 h,洗涤缓冲液洗涤3次,加入1:1000稀释的酶标二抗(HRP标记羊抗鼠IgG抗体)500 μL,37℃孵育30 min后,洗涤缓冲液洗涤3次,各反应孔中加入TMB底物溶液500 μL,37℃显色20 min加入2 mol·L⁻¹硫酸500 μL终止显色。从各反应管中取200 μL终止显色后液体,加入标准曲线微孔板的空白孔中,每个支架平行检测3个孔。将样品孔的吸光度值带入4参数曲线方程,计算支架上抗体含量。

2.3 抗体支架上抗体结合牢固度测定 取抗体支架样品,使用金属架悬置于1 L烧杯中的生理盐水,在37℃下200 r·min⁻¹搅拌,模拟体内冲刷,冲刷1 h后,取出支架。按照“2.2.2”项下方法制备显色溶液。同时取未冲刷支架制备显色溶液作为对照。读取冲刷支架和未冲刷支架的显色溶液的吸光度,进行t检验。

2.4 显微镜记数法测定抗体支架捕获细胞能力 KG-1a细胞重悬于样品稀释液中,调整浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将DAPI按 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入KG-1a悬液,37℃避光孵育30 min,孵育结束后,使用样品稀释液洗涤2遍,调整细胞浓度至 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将剪开铺平的裸支架、抗体支架置于DAPI染色细胞悬液中,37℃避光孵育60 min,孵育结束后,使用磷酸盐缓冲液涮洗支架3次。荧光显微镜下,使用紫外激发光观察抗体支架和裸支架上的细胞分布情况,并拍照。采用图像分析软件,用绘图软件随机选取支架丝上的5个范围,计算所选面积和所选范围内的细胞数量,计算单位面积捕获细胞数(个·cm⁻²)。

3 结果

3.1 流式细胞术检测抗CD34单克隆抗体结合KG-1a细胞的能力 以FITC荧光强度为X轴,细胞数为Y轴,做直方图。设定FITC荧光强度 $1 \sim 10^4$ 为Marker 1, FITC荧光强度 $10^4 \sim 10^5$ 为Marker 2,位于Marker 1中的细胞为抗CD34抗体结合阴性细胞,Marker 2中的细胞为抗CD34抗体结合阳性细胞。阳性对照样品的细胞平均阳性率为96.54%,细胞表面荧光强度几何均值为407.86(图1-A);抗CD34 mAb浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,细胞平均阳性率为96.34%,细胞表面荧光强度几何均值为362.38(图1-B);鼠IgG1同型对照样品的细胞平均阳性

率为 0.565%，细胞表面荧光强度几何均值为 14.41 (图 1-C)；阴性对照样品的细胞平均阳性率为 1.29%，细胞表面荧光强度几何均值为 13.71(图 1-D)。抗 CD34 McAb 样品的细胞阳性率同阳性对

照样品的细胞阳性率相当，均大于 95%。同型对照样品和阴性对照样品的细胞平均阳性率均低于 2%。结果表明，检测的抗 CD34 McAb 可同 CD34 (+) KG-1a 细胞特异性结合。

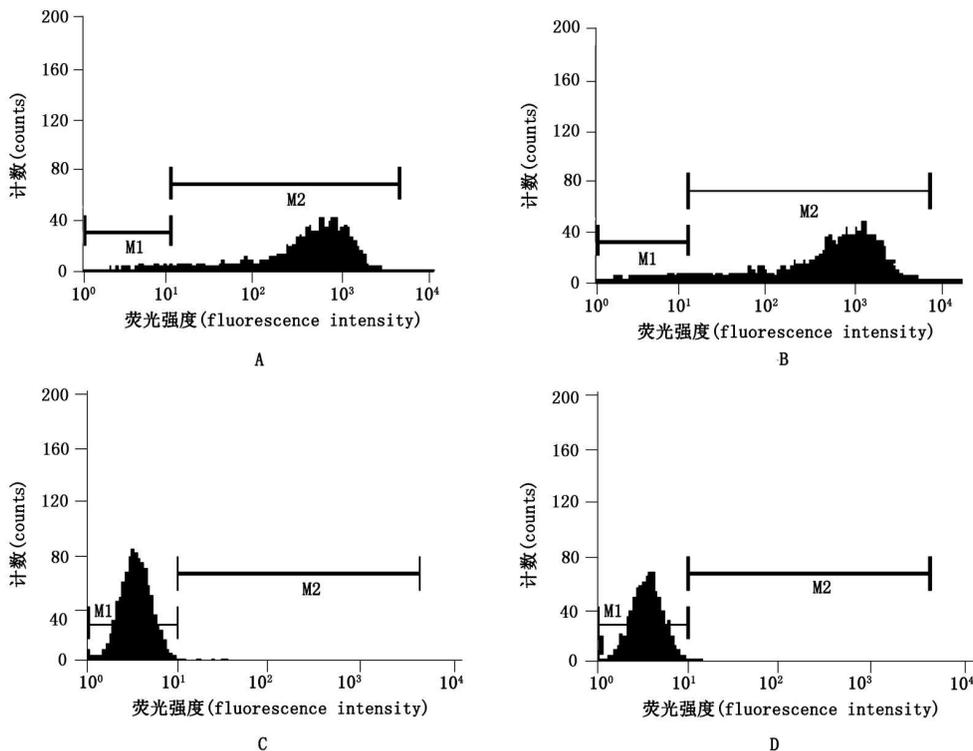


图 1 流式细胞术检测抗 CD34 McAb 体外结合 KG-1a 细胞的结果

Fig 1 KG-1a cell binding ability test of anti-CD34 McAb by FACS

A. 阳性对照 (positive control) B. 检测样品 (tested sample) C. 同型对照 (allotype control) D. 阴性对照 (negative control)

3.2 抗体支架上抗体含量测定 按“2.2”项下方法检测，绘制的标准曲线见图 2 使用 softmax 5.0 软件拟合的 4 参数曲线方程为：

$$y = \frac{0.005 - 0.884}{[1 + (\frac{x}{22.55})^{1.357}]} + 0.884 \quad R^2 = 0.989$$

3 个检测的抗体支架样品孔的平均吸光度为 0.205，3 个裸支架对照样品孔平均吸光度为 0.008。抗 CD34 McAb 支架上抗体的平均含量为 4.588 ng，支架表面积为 0.09 cm²，则支架上单位面积 (cm²) 的包被抗体量为 50.97 ng·cm⁻²。

3.3 抗体支架上抗体结合牢固度测定 按照“2.2.2”项下方法，对各 3 个未冲刷和体外模拟冲刷 1 h 的抗 CD34 McAb 包被支架进行检测。未冲刷支架的吸光度分别为 0.203, 0.207, 0.231，均值为 0.21367，方差为 0.015144。冲刷后支架的吸光度分别为 0.201, 0.212, 0.203，均值为 0.20533，方差为 0.0058595。以是否经过冲刷为变量，对 2 组支架的吸光度进行成对检验，P = 0.49。结果表明，经体外模

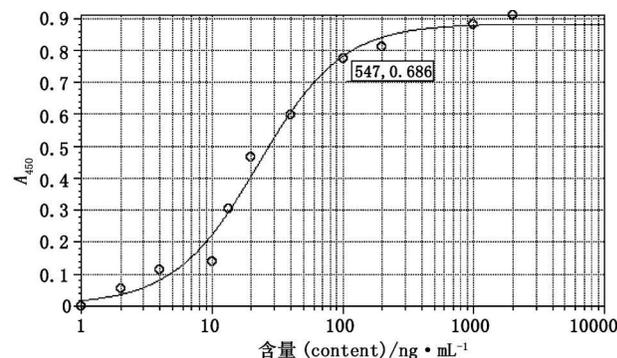


图 2 支架上抗体含量检测中绘制的 4 参数标准曲线

Fig 2 Standard curve in coated McAb content test

拟冲刷 1 h 后，支架上抗体含量无明显变化。

3.4 抗体支架捕获细胞能力测定 按“2.4”项下方法测定，对捕获细胞后支架照像，结果见图 3~6。由图 3~6 可见，抗 CD34 McAb 包被支架上捕获的 KG-1a 细胞分布均匀 (图 3)，支架的连接和支撑结构处均可有效结合细胞 (图 4、图 5)，同时未包被支架不能结合 KG-1a 细胞 (图 6)。使用图像分析软

件对随机选定区域内捕获细胞数计数, 并计算支架上捕获细胞密度为 $4 \text{万个} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

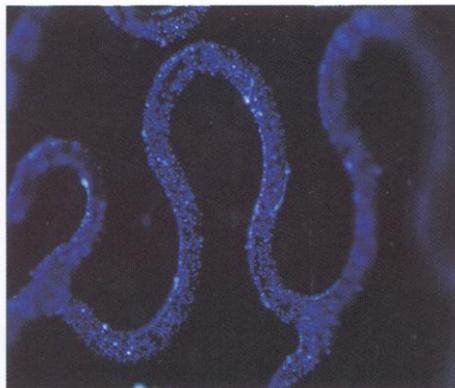


图 3 抗 CD34 M cAb 包被支架上捕获 KG-1a 细胞的概览
Fig 3 General view of KG-1a cell captured by anti-CD34 M cAb coated coronary stent

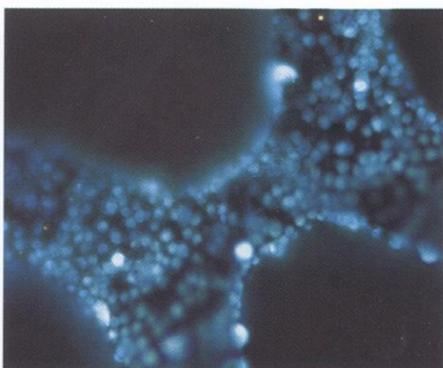


图 4 抗 CD34 M cAb 支架上连接结构处的 KG-1a 细胞捕获情况
Fig 4 KG-1a cell captured on the joint structure of mAb coated coronary stent

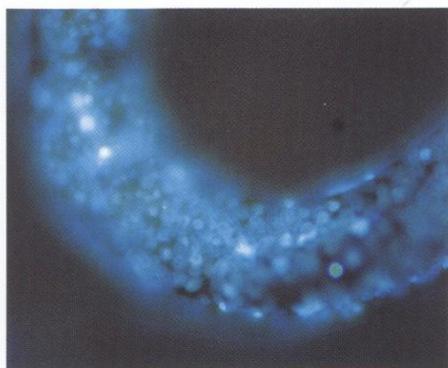


图 5 抗 CD34 M cAb 支架上支撑结构处的 KG-1a 细胞捕获情况
Fig 5 KG-1a cell captured on the brace structure of mAb coated coronary stent

4 讨论

流式细胞术检测方法是目前较常用的检测抗体同细胞表面对应抗原结合能力的方法, 一定浓度的

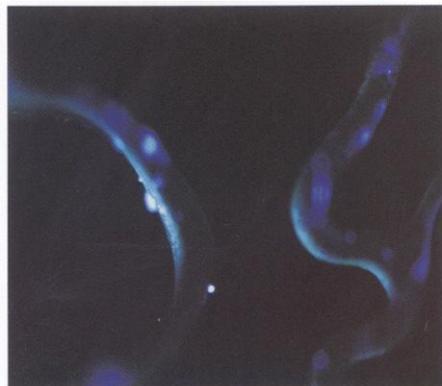


图 6 裸支架上的 KG-1a 细胞捕获情况
Fig 6 KG-1a cell captured on the nude coronary stent

抗体同位于细胞表面的靶分子结合后, 使用荧光标记的二抗染色, 并通过流式细胞仪检测染色阳性细胞。若一抗在一定浓度下使染色阳性细胞达到一定比例, 则说明抗体结合细胞表面抗原的能力达到要求水平, 如: 本文中设定抗 CD34 抗体浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 染色阳性细胞应达到 95%。如前所述, 内皮祖细胞表面特异性表达 CD34 分子, 检测中使用表面表达 CD34 分子的 KG-1a 细胞代替内皮祖细胞, 使用流式细胞术方法对包被用抗 CD34 单克隆抗体捕获内皮祖细胞的能力进行评价, 结果表明, 在浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抗体可结合 95% 以上的 KG-1a 细胞^[7-9], 抗 CD34 单克隆抗体同细胞表面的 CD34 分子的结合能力达到所要求的水平。

抗体支架上抗体含量测定的结果 $50.97 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$, 单克隆抗体相对分子质量约为 16 万 ~ 18 万, 对应的支架上抗体分子密度约为 $2 \times 10^{11} \text{ 个} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。免疫球蛋白的直径为 20~25 nm, 单个抗体分子所占面积约为 $1.5 \times 10^3 \text{ nm}^2$, 而 $2 \times 10^{11} \text{ 个} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的支架上单位面积抗体含量对应的每个抗体分子所占面积为 500 nm^2 , 检测结果代表的抗体含量对于抗体在支架上的分布来说略显“拥挤”, 但是该方法简单、快速, 并不将该检测项目的结果作为对支架上抗体绝对含量进行质控的考察参数, 而是作为考察生产过程一致性和批间一致性的一个参数。作为一个代表性参数, 可以将该方法的检测结果同支架上抗体的绝对含量进行换算, 得出支架上抗体的绝对含量。

目前有多种方法可以将生物大分子偶联于冠状动脉支架, 目前研究中常采用的生物大分子同支架偶联的方法为先将支架上喷涂偶联剂和胶原的混和涂层, 然后采用 SPDP 偶联方法将生物大分子同喷涂的偶联剂偶联的方法, 无论采用何种偶联方法, 偶联物

结合牢固性都是重点考虑的问题^[2,10]。抗体结合牢固性检测中,采用模拟体外冲刷环境冲刷 1 h后,支架上抗体含量并没有显著改变。说明抗体支架制备中采用的偶联技术的牢固性还是令人满意的。

在检测上述项目后,对包被了鼠源抗 CD34 M cAb的冠状动脉支架进行捕获 CD34(+) KG-1a 细胞的能力进行检测,结果表明,抗体支架在体外模拟状态下可有效捕获靶细胞,支架上捕获细胞密度为 4万个·cm⁻²。

上述几种体外检测方法结合,可对鼠源抗 CD34 单克隆抗体包被冠状动脉支架的生物学质控参数进行全面有效的检测,而且对该制品的质控检测经验也可用于新型的赋予生物学特性的治疗用医疗器械的质控。

参考文献

- 1 Menown I, Lowe R, Penn I. Passive stent coatings in the drug-eluting era. *J Invasive Cardiol* 2005 17(4): 222
- 2 Zhou Z, Shi S, Song M, et al. Development of transgenic endothelial progenitor cell-seeded stents. *J Biomater Res A*, 2009, 91(2): 623
- 3 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275: 964
- 4 Ho HH, Chow WH, Ko LY, et al. Successful use of endothelial pro-

- genitor cell capture stent for treatment of left main coronary artery disease before non-cardiac surgery for abdominal aortic aneurysm. *Int J Cardiol* 2009, 143(2): e27
- 5 Wendel HP, Avci-Adali M, Zimmer G. Endothelial progenitor cell capture stents- hype or hope? *Int J Cardiol*, 2010 141(1): e20
- 6 Aoki J, Semuy PW, van Beusekom H, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FM (Healthy endothelial accelerated lining inhibits neointimal growth - first in man) registry. *J Am Coll Cardiol* 2005, 45: 1574
- 7 Civin CJ, Banquerigo ML, Strauss LC, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol* 1987 15(1): 10
- 8 Civin CJ, Strauss LC, Brovall C, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984 133(1): 157
- 9 Vaughan W P, Civin CJ, Weisenburger DD, et al. Acute leukemia expressing the normal human hematopoietic stem cell membrane glycoprotein CD34(MY10). *Leukemia*, 1988 2(10): 661
- 10 Jin X, Leng XG, Liu LX, et al. A novel anti-DNA antibody modified coronary stent for site-specific plasmid DNA delivery. *Acta Acad Med Sin* (中国医学科学院学报), 2006 28(5): 665

(本文于 2010年 6月 2日收到)

《药物分析杂志》继续被评为 2011年度中国科协精品科技期刊示范项目

按照《中国科协精品科技期刊工程项目管理办法(试行)》的有关规定,《药物分析杂志》参与了 2010年度精品科技期刊示范项目 和英文版期刊国际推广项目 总结验收及 2011年度精品科技期刊新增示范项目 评审工作。根据中国科协的评审结果,《药物分析杂志》继续成为 2011年度精品科技期刊示范项目 C类项目。评选分 A、B、C三类,各类项目 资助额度分别为每项 25万、15万、5万元/年。中国科协从 2006年开始评选精品期刊项目 至今,《药物分析杂志》已连续 6年被评为中国科协精品科技期刊示范项目 (C类)。