

不同孵育系统下人体外细胞因子释放差异的评价方法研究

刘静¹, 王全军^{1,2}, 聂荷香¹, 许慧彬^{*}, 董延生^{1*}

1. 国科赛赋河北医药技术有限公司, 河北 固安 065500

2. 北京赛赋医药研究院有限公司, 北京 102600

摘要: 目的 以3种不同的抗体包被方法, 评估人外周血细胞在OKT3刺激前后细胞分泌各种细胞因子的含量, 为免疫治疗药物上市前的临床前及临床研究提供理论依据。方法 健康人外周血经密度梯度离心法制备得到外周血单个核细胞(PBMC)后液氮罐中冻存备用, 在固相干法、固相湿法(包被24、48 h)及液相法条件下, 不同OKT3刺激浓度(1、2 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$)、刺激时间(24、48 h)下, 以多功能流式点阵仪(Luminex)检测分泌细胞因子的表达水平。结果 固相干法中OKT3刺激PBMC细胞释放细胞因子显著, OKT3包被48 h、刺激48 h各细胞因子(IL-2、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α)分别为阴性对照的6、2、22、214、51倍(1 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$), 5、2、26、194、48倍(2 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$); OKT3包被48 h、刺激24 h各细胞因子(IL-2、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α)分别为阴性对照的3、2、2、171、19倍(1 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$), 4、2、3、174、21倍(2 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$); OKT3包被24 h、刺激48 h试验组中, 各细胞因子(IL-2、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α)分别为阴性对照的6、2、28、356、50倍(1 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$), 6、2、35、349、64倍(2 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$); OKT3包被24 h、刺激24 h各细胞因子(IL-2、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α)分别为阴性对照的3、2、1、127、16倍(1 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$), 3、1、2、115、13倍(2 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$), 表明随着OKT3包被时间延长、与PBMC作用时间延长组别效果更明显; 固相湿法与液相法中IL-10呈现明显的含量降低, 且二者在释放程度上相当, 无组别关系。结论 固相干法孵育系统较固相湿法及液相法有明显的优势, 并且OKT3作为阳性对照刺激PBMC诱导人体外细胞因子释放效果显著, 可以在药物非临床安全性评价遵循GLP的毒理学试验中使用该方法评估药物引起细胞因子风暴的风险。

关键词: 孵育系统; 外周血; 外周血单个核细胞; CD3单克隆抗体; 多功能流式点阵仪; 细胞因子风暴

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)09-2067-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.014

Study on evaluation method of differences in human extracellular cytokine release under different incubation systems

LIU Jing¹, WANG Quanjun^{1,2}, NIE Hexiang¹, XU Huibin¹, DONG Yansheng¹

1. Saifu Laboratories Gu'an Co., Ltd. (former name SAFE Medical Technology Co., Ltd.), GuAn 065500, China

2. Salfu Laboratories Co., Ltd., Beijing 102600, China

Abstract: Objective Three antibody coating methods were used to evaluate assay of various cytokines secreted by human peripheral blood cells (PBMCs) before and after OKT3 stimulation so as to provide theoretical basis for preclinical and clinical studies of immunotherapy drugs prior to marketing. **Methods** PBMCs were prepared by healthy human peripheral blood by density gradient centrifugation and cryopreserved in a LN tank for backup. The expression level of cytokines secreted after OKT3 stimulation at different concentrations (1 and 2 $\mu\text{g}\cdot\text{well}^{-1}$) and time was detected by Luminex based on the solid-phase dry, solid-phase wet (coating for 24 and 48 h), and liquid phase methods. **Results** In the solid phase immobilized method, OKT3 stimulated PBMC cells to release cytokines significantly. In the group where OKT3 was coated for 48 hours and stimulated for 48 hours, the levels of cytokines (IL-2, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α) were 6, 2, 22, 214, and 51 times higher than those of the negative control group (1 $\mu\text{g}\cdot\text{well}^{-1}$), 5, 2, 26, 194, and 48 times higher (2 $\mu\text{g}\cdot\text{well}^{-1}$); in the group where OKT3 was coated for 48 hours and stimulated for 24 hours, the

收稿日期: 2024-01-22

基金项目: 京津冀基础研究合作专项项目(仿生活性纳米颗粒时序靶向人工血管促进血管再生与相关机制探究)

第一作者: 刘静 E-mail: liujing@safeglp.com

*共同通信作者: 许慧彬 E-mail: xuhuibin@safeglp.com

董延生 E-mail: dongyansheng@safeglp.com

levels of cytokines were 3, 2, 2, 171, and 19 times higher than those of the negative control group ($1 \mu\text{g}\cdot\text{well}^{-1}$), 4, 2, 3, 174, and 21 times higher ($2 \mu\text{g}\cdot\text{well}^{-1}$); in the group where OKT3 was coated for 24 hours and stimulated for 48 hours, the levels of cytokines were 6, 2, 28, 356, and 50 times higher than those of the negative control group ($1 \mu\text{g}\cdot\text{well}^{-1}$), 6, 2, 35, 349, and 64 times higher ($2 \mu\text{g}\cdot\text{well}^{-1}$); in the group where OKT3 was coated for 24 hours and stimulated for 24 hours, the levels of cytokines were 3, 2, 1, 127, and 16 times higher than those of the negative control group ($1 \mu\text{g}\cdot\text{well}^{-1}$), 3, 1, 2, 115, and 13 times higher ($2 \mu\text{g}\cdot\text{well}^{-1}$), indicating that the effects were more obvious with longer OKT3 coating time and longer time of interaction between OKT3 and PBMC. In the solid phase wet method and liquid phase method, IL-10 showed a marked decrease in content, and the two methods showed equivalent release levels, with no relationship to the group. **Conclusion** There was an edge of solid-phase dry method over the other two methods. Significant cytokine release *in vitro* was observed after OKT3 stimulation as a positive control. Therefore, solid-phase dry method can be used to assess the risk of cytokine storm triggered in GLP toxicology studies.

Key words: incubation system; peripheral blood; peripheral blood mononuclear cells (PBMC); CD3 monoclonal antibody; Luminex; cytokine storm

细胞因子是抗原或其他因子刺激免疫细胞和其他功能性细胞产生并分泌的一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质,具有调节固有免疫和适应性免疫、血细胞生成、细胞生长^[1]、多能造血干细胞(APSC)以及损伤组织修复等多种功能,在调控机体免疫和非免疫系统发育与功能中发挥重要作用。根据细胞因子的功能,可以分为以下6类:白细胞介素(IL)、干扰素(IFN)、肿瘤坏死因子(TNF)、集落刺激因子(CSF)、趋化因子、生长因子(GF)^[2]等,而在药物临床试验中,以IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ 及TNF- α 的显著升高最为明显,诱发严重的不良事件。

细胞因子释放综合征(CRS),曾被称为细胞因子风暴,多发于免疫失调的疾病,其特征是全身症状、全身炎症和多器官功能障碍,如果治疗不当,可导致多器官衰竭^[3]。人体在受到外来物质刺激时,免疫系统为抵抗外来物质做出的免疫反应保护机制,免疫细胞在发挥免疫防御功能时产生并释放细胞因子,进而抑制或杀死病原体,维持机体的内环境稳态,保证各器官的良好运行。近年来,随着创新生物技术药物的不断发展,越来越多的免疫治疗药物纷纷上市,在病人获益的同时,临床中的不良反应也随之出现,进行免疫检查点抑制剂治疗时也可能出现CRS,但概率极低^[4]。英国伦敦1家医院在当地监管部门批准后进行了1项名为CD28单抗的超级激动剂TGN1412^[5]临床I期试验,备受各国药品监管机构、政府及众多科学家的广泛关注,6名接受受试物的志愿者均发生了严重的不良反应,包括全身肿胀、严重头痛、高烧、恶心等,伴随肝、肾等器官的衰竭。且TeGenero公司提交的毒理学试验数据完整,均在当局要求的法规行为内执行,未发生任何不良事件,整个试验流程合理、合法、合规,经调查后发现TGN1412主要与CD28结合直接活化

T细胞,而食蟹猴并不表达CD28^[6]。新型冠状病毒感染大流行期间,1例长期接受PD-1疗法的结直肠癌(CRC)患者在接种由辉瑞/BioNTech开发的mRNA新冠疫苗BNT162b2后^[7],出现了肌肉疼痛、腹泻及发烧等症状,即使服用了布洛芬,症状仍未得到缓解,这也提示mRNA疫苗接种和其发生CRS的临床表现有密切的时间关联。利妥昔单抗上市之初,Lim等^[8]报道了1例慢性淋巴细胞白血病(CLL)女性患者在输注利妥昔单抗后2h出现寒战,1h后仍出现血压下降、呼吸困难,9h后因呼吸循环衰竭死亡。同期Winkler^[9]报告了9例利妥昔单抗治疗CLL导致CRS的死亡病例。因此细胞因子释放试验(CRA)已常被用作候选治疗药物的危害识别和风险评估工具,特别是可能引起患者不良促炎细胞因子反应的单克隆抗体^[10]。多个实验室针对不同类型的单克隆抗体进行了针对不同细胞因子释放的相对能力比较^[11]。针对不同单抗类药物在临床试验中的反应程度,对各单抗药物的强弱反应进行了排序:TGN1412>OKT3>阿仑单抗>利妥昔单抗^[12]。

CRS的发生机制尚未明确,与近年生物制品的不断更新迭代有关,新技术的不断发展支持药物的良好创新,大多药研公司在进行药物设计时,会尽量避免与已报道的可能诱发CRS的结构冲突。《药物免疫原性研究技术指导原则》中,关于药物免疫原性的评价方法中阐述了进行体外细胞因子释放试验的重要性,可弥补因种属免疫系统的差异而导致动物模型不能完全模拟人体内免疫激发过程中的缺陷。有证据表明^[13],引发细胞因子释放的机制可能与以下有关,(1)可溶性抗体通过特异性的抗原决定簇直接结合至效应细胞表面的同源受体,直接激发效应细胞产生并释放细胞因子;(2)可溶性

抗体与效应细胞表面同源受体结合,并与已存在的抗IgG抗体交叉结合,引起效应细胞激活并释放细胞因子;(3)可溶性抗体微弱地结合在效应细胞表面,通过Fc与邻近非效应细胞表面FcR结合,引起效应细胞表面抗原聚集,刺激效应细胞释放细胞因子;(4)可溶性抗体结合至效应细胞,通过Fc与邻近的非效应细胞表面FcR交叉结合,激活非效应细胞(含有FcR的细胞)释放大细胞因子。人体内发生的免疫反应是由多个复杂的免疫器官交叉作用的结果,存在多种交叉的反应机制和级联效果,在药物CRS的机制研究中存在诸多不确定因素及技术困难。

由于CRS发生的机制尚不明朗,因此在临床前研究中并没有一种可以针对所有类型药物进行CRS预测的平台,仍以多种方法的检测结果互相印证,以确证药物的潜在不良风险,因此有必要开发一种非特异性的,用以在非临床试验中灵活、高通量的检测细胞因子的方法。临床前使用人源细胞进行体外检测细胞因子释放的方法,可预测生物大分子药物在体内从免疫细胞中诱导细胞因子释放的潜力^[14],常用的方法有液相及固相2种孵育系统,样本包括血浆、血清及外周血单个核细胞(PBMC)等。需根据药物的靶向作用选择合适的样本进行试验,若药物直接靶向免疫细胞,推荐采用PBMC进行试验;若药物的作用机制可能存在与FcγRs结合,则更适合在包含表达FcγRs的细胞的全血中进行试验。阳性对照品的选择,应首先考虑与药物具有预期相同或类似的作用机制者,以便更好评估被测试药物与阳性对照品的显著关系,在评价或确证药物细胞因子变化的试验中,更具有科学性及适用于支持临床试验的试验数据。

为模拟真实检测条件,规避因药物、医院伦理委员会等现实因素的影响,本试验以冻存后复苏PBMC为样本,以CD3单抗OKT3为阳性对照品,通过不同刺激浓度、不同刺激时间评价固定化抗体刺激(固相法)、可溶性抗体刺激(液相法)下细胞因子释放的能力,使用Luminex检测样本。为药物临床前及临床试验中提供一种切实可行的、可模拟并合理预测药物诱发细胞因子表达水平变化的方法。

1 材料

1.1 主要仪器

20040-012型多功能流式点阵仪(Luminex, Luminex's Licensed Technology); DW-86L388J型超

低温冰箱(海尔集团公司); 240i型二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific); BSC-1300-II-A2型生物安全柜(山东新华医疗器械股份有限公司); LUX-12型电热恒温水浴锅(北京陆希科技有限公司); Cellometer K2型自动细胞技术仪(Nexcelom Bioscience); 离心机(湖南可成仪器设备有限公司); 96T型磁力版(Thermo Fisher Scientific); MX100-4A型微孔板振荡器(杭州奥盛仪器仪器有限公司); SI-0256型涡旋混合器(Scientific Industries, Inc.); HYC-310型医用冷藏箱(青岛海尔特种电器有限公司); ELGA型超纯水纯化系统(ELGA LabWater)。

1.2 主要试剂

CD3单抗OKT3(美国R&D Systems公司,货号16-0037-81); ViaStain AOPI Staining Solution(Nexcelom Bioscience,货号CS2-0106-5mL); RPMI 1640培养基(货号31800)、1×无菌PBS缓冲液(货号P1020),北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清(FBS)(Transgen Biotech Co., Ltd., 货号FS301-02); Human ProcartaPlex Mix&Match 10-plex(Thermo Fisher Scientific,货号PPX-10-MXT2AV3); 淋巴细胞分离液,商用名Ficoll-Paque PLUS(Cytiva,货号17144002); 红细胞裂解液(Becton, Dickinson and Company,货号555899); 细胞冻存液(Biolife Solutions,货号210102)

1.3 样本来源

健康人肝素钠抗凝全血,采集自河北中石油中心医院,该样本已通过医院伦理委员会审批,审批编号为IRB2023-005-01,受试者随机号为SAFE-14。

2 方法

2.1 PBMC细胞制备与冻存

于生物安全柜中,取健康人外周血约4 mL,加入4 mL无菌PBS溶液,稀释,轻柔混匀;取6 mL Ficoll-Paque PLUS分离液于无菌离心管中,将稀释后的血液样本贴上壁轻柔加入分离液中,保持界面清晰;室温 $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心约25 min,离心后,使用塑料滴管吸取白膜层,移至加入5 mL PBS的无菌离心管内,室温 $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心8 min,弃上清,加入3 mL PBS重悬细胞;室温 $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,弃上清,轻柔拨动离心管,使细胞散开,加入1×红细胞裂解液2 mL,裂红2 min,加入10 mL PBS终止反应,室温 $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,弃上清,再用10 mL工作培养基洗1遍,加入适量细胞冻存液重悬细胞,在程序降温盒中过夜冻存,次日转移至液氮罐中。

2.2 细胞复苏与计数

将冻存的细胞从液氮罐中取出,迅速放于37℃恒温水浴锅中匀速平移摇晃解冻,至冰块即将完全消失(绿豆般大小);迅速转移细胞至含4 mL已平衡至室温工作培养基的15 mL无菌离心管中,室温1 500 r·min⁻¹离心8 min,加入4 mL工作培养基重悬后再次离心,弃上清,加入1 mL工作培养基重悬,并用细胞计数仪计数、记录。

2.3 试验操作

用工作培养基将OKT3稀释至20 μg·mL⁻¹,在板孔中分别加入50 μL(终浓度为每孔1 μg)、100 μL(终浓度为每孔2 μg),对照组不加药。固相系统分为固相干法及固相湿法,液相系统为液相法。固相干法:在板孔中加入上述体积的OKT3,分别在CO₂培养箱中孵育24、48 h,孵育完成后放在生物安全柜中通风吹干,备用;固相湿法:在板孔中加入上述体积的OKT3,分别在CO₂培养箱中孵育24、48 h,孵育完成后备用;液相法:在板孔中加入上述体积的OKT3,在2~8℃冰箱中孵育24 h。

待所有孵育系统处理完成后,调整细胞浓度为1.5×10⁶·mL⁻¹,取100 μL细胞悬液加在各板孔中,调整各孔中体积为200 μL(具体体积见表1)。轻轻晃动培养板,使细胞悬液与OKT3充分接触,在CO₂培养箱中共刺激24、48 h。收集培养液上清转移至EP

表1 OKT3-悬液体积对应表

孵育系统	OKT3/μL	细胞悬液/μL	培养基/μL	终体积/μL
固相干法	50	100	100	200
	100	100	100	200
固相湿法	50	100	50	200
	100	100	0	200
液相法	50	100	50	200
	100	100	0	200

管中,冻储备检。按照试剂盒说明书要求,使用Luminex上机检测IL-2、IL-6、IL-10、IFN-γ、TNF-α水平,并计算释放倍数。

释放倍数(取整)=OKT3组细胞因子含量均值/阴性对照组细胞因子含量均值

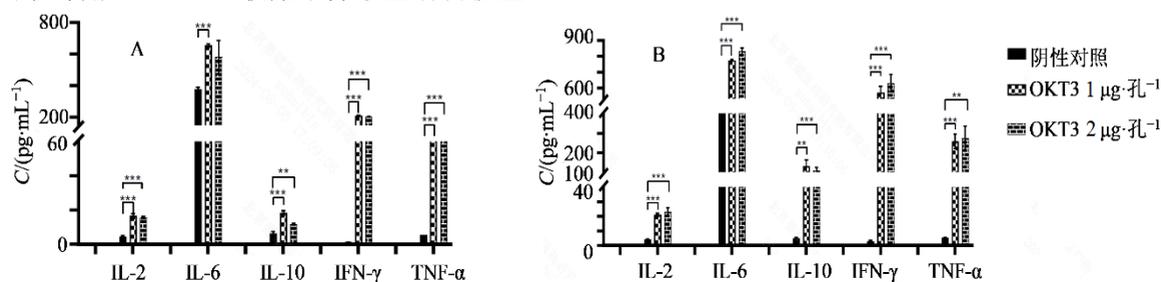
2.4 统计方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为组间的差异具有显著性差异。

3 结果

3.1 固相干法结果

OKT3包被48 h、PBMC细胞与OKT3共刺激培养24、48 h时,与阴性对照组相比,除OKT3终浓度为每孔2 μg时(刺激24 h),IL-6无统计学上的显著性差异外,其余细胞因子含量均显著升高($P < 0.01$ 、 0.001),见图1。



与阴性对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs negative control group.

图1 固相干法抗体包被48 h时,PBMC刺激24(A)、48(B) h细胞因子间的水平变化

Fig. 1 Antibody was coated for 48 h by solid coherence method, PBMC stimulated level changes of different cytokines at 24 (A) and 48 (B) h

OKT3包被48 h,各细胞因子含量均无刺激浓度上的差异。与培养24 h相比,阴性对照组培养48 h时自分泌细胞因子含量未见明显的升高,阳性对照组IL-10、IFN-γ、TNF-α表现出明显的升高,见表2。

OKT3包被24 h、PBMC细胞与OKT3共刺激培养24、48 h时,与阴性对照组相比,OKT3终浓度为1、2 μg·孔⁻¹时,IL-2、IL-6、IL-10、IFN-γ、TNF-α均呈现出显著的含量升高($P < 0.01$ 、 0.001),见图2。

OKT3包被24 h,各细胞因子含量均无刺激浓

表2 刺激时间与细胞因子释放倍数关系(固相干法48 h)

Table 2 Release multiple relation between stimulation time and cytokine release factor (48 h for Solid coherence method)

刺激时间/ h	刺激浓度/ (μg·孔 ⁻¹)	释放倍数				
		IL-2	IL-6	IL-10	IFN-γ	TNF-α
24	1	4	2	3	174	21
	2	3	2	2	171	19
48	1	5	2	26	194	48
	2	6	2	22	214	51

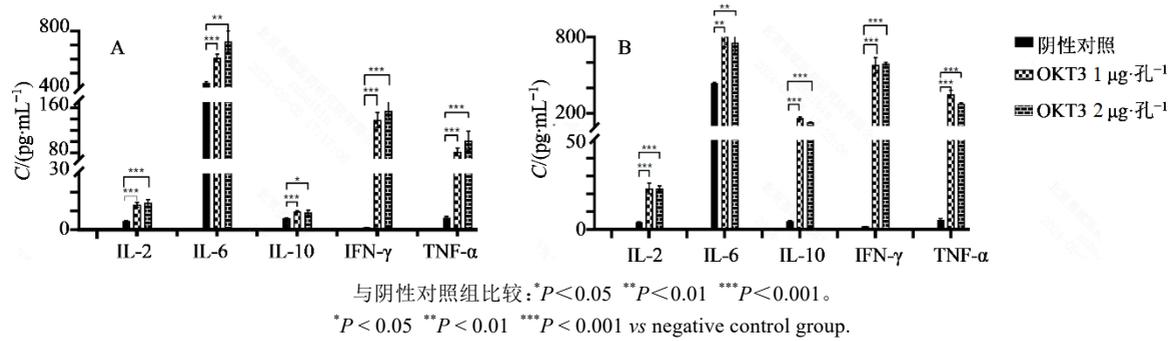


图2 固相干法抗体包被24 h时, PBMC刺激24(A)、48(B) h细胞因子间的水平变化

Fig. 2 Antibody was coated for 24 h by solid coherence method, PBMC stimulated level changes of different cytokines at 24 (A) and 48 (B) h

度上的差异。与培养24 h相比,阴性对照组培养48 h时自分泌细胞因子含量未见明显的升高,阳性对照组IL-10、IFN- γ 、TNF- α 表现出明显的升高,见表3。

3.2 固相湿法结果

OKT3包被48 h、PBMC细胞与OKT3共刺激培养24、48 h时,与阴性对照组相比,除OKT3终浓度为2 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$ 时(刺激48 h),IL-6无统计学上的显著性差异,其余均呈现显著性差异($P < 0.05$ 、0.01、0.001),与固相干法不同,此方法处理,IL-10的含量骤降,IFN- γ 表达升高显著。见图3。

表3 刺激时间与细胞因子释放倍数(固相干法24 h)

Table 3 Release multiple relation between stimulation time and cytokine release factor (24 h for Solid coherence method)

刺激时间/h	刺激浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$)	释放倍数				
		IL-2	IL-6	IL-10	IFN- γ	TNF- α
24	1	3	1	2	115	13
	2	3	2	1	127	16
48	1	6	2	35	349	64
	2	6	2	28	356	50

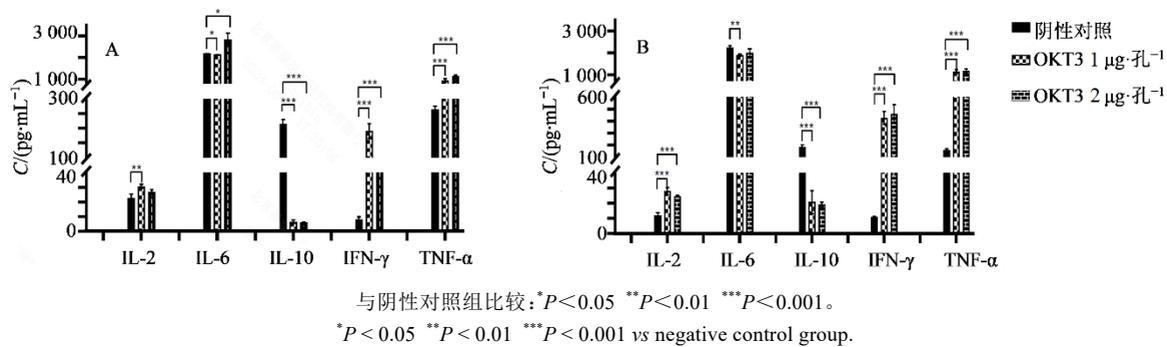


图3 固相湿法抗体包被48 h时, PBMC刺激24(A)、48(B) h细胞因子间的水平变化

Fig. 3 Antibody was coated for 48 h with solid-phase wet, PBMC stimulated level changes of different cytokines at 24 (A) and 48 (B) h

OKT3以固相湿法包被48 h,各细胞因子含量均无刺激浓度上的差异。与培养24 h相比,阴性对照组培养48 h时自分泌细胞因子含量未见明显的升高,阳性对照组IFN- γ 表现出明显的升高,见表4。

OKT3包被24 h、PBMC细胞与OKT3共刺激培养24、48 h时,与阴性对照组相比,IL-2在刺激24 h、刺激浓度为2 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$,IL-6在刺激时间24 h(无刺激浓度区别),刺激时间48 h、刺激浓度为1 $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$ 时无统计学意义,其余均呈现有显著性差异($P < 0.001$),IL-10的含量仍出现骤降的趋势,IFN- γ 表达升高显著。见图4。

表4 刺激时间与细胞因子释放倍数关系(固相湿法48 h)

Table 4 Relationship between stimulation time and cytokine release factor (48 h for Solid-phase wet method)

刺激时间/h	刺激浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$)	释放倍数				
		IL-2	IL-6	IL-10	IFN- γ	TNF- α
24	1	1	1	0	23	4
	2	1	1	0	11	4
48	1	2	1	0	40	7
	2	2	1	0	43	8

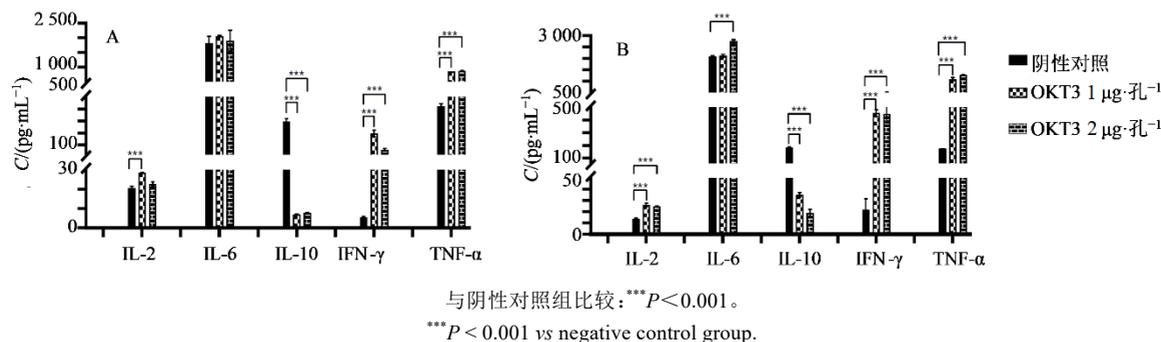


图4 固相湿法抗体包被24 h时, PBMC刺激24(A)、48(B) h细胞因子间的水平变化

Fig. 4 Antibody was coated for 24 h with solid-phase wet, PBMC stimulated level changes of different cytokines at 24 (A) and 48 (B) h

OKT3以固相湿法包被24 h,各细胞因子含量均无刺激浓度上的差异。与培养24 h相比,阴性对照组培养48 h时自分泌细胞因子含量未见明显的升高,阳性对照组IFN- γ 表现出明显的升高,见表5。

表5 刺激时间与细胞因子释放倍数关系(固相湿法24 h)

Table 5 Relationship between stimulation time and cytokine release factor (24 h for Solid-phase wet method)

刺激时间/h	刺激浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$)	释放倍数				
		IL-2	IL-6	IL-10	IFN- γ	TNF- α
24	1	1	1	0	28	3
	2	1	1	0	15	3
48	1	2	1	0	21	6
	2	2	1	0	21	7

3.3 液相法结果

OKT3包被24 h、PBMC细胞与OKT3共刺激培养24、48 h时,与阴性对照组相比,IL-6在刺激浓度为 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$ 时均无统计学意义,未表现出刺激时间上的差异,其余均呈现有显著性差异($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),IL-10的含量仍出现骤降的趋势,IFN- γ 表达升高显著。见图5。

OKT3以固相湿法包被24 h,各细胞因子含量

均无刺激浓度上的差异。与培养24 h相比,阴性对照组培养48 h时自分泌细胞因子含量未见明显的升高,阳性对照组IFN- γ 表现出明显的升高,见表6。

4 讨论

在进行体外细胞因子释放试验时,需要根据药物的作用靶点及作用机制合理选择合适的阳性对照品,OKT3、TGN1412等可直接靶向T细胞释放细胞因子,阿仑单抗、利妥昔单抗等则可能通过抗体依赖的细胞毒性(ADCC)、补体依赖的细胞毒性(CDC)效应作用非效应细胞释放细胞因子^[15],此外,若药物包裹了如病毒衣壳等递送、包裹系统,脱靶效应也会在一定程度上诱发CRS^[16]

本研究中通过对固相法、液相法孵育系统的对比,结合前人的一些试验方法设计,数据表明固相湿法及液相法2种孵育系统中的细胞因子呈现出相同或相似的结果,无孵育系统上的差别。例如IL-6未表现试验组间的显著性差异,IL-10则出现显著的含量下降。而在固相干法孵育系统中(OKT3刺激48 h),各细胞因子均呈现出显著的含量升高,且试验结果可以支持因阳性对照品包被时间、刺激时间上的差异处理导致的细胞因子含量变化,即包被时间、刺激时间更长的试验组,样本中细胞因子的含

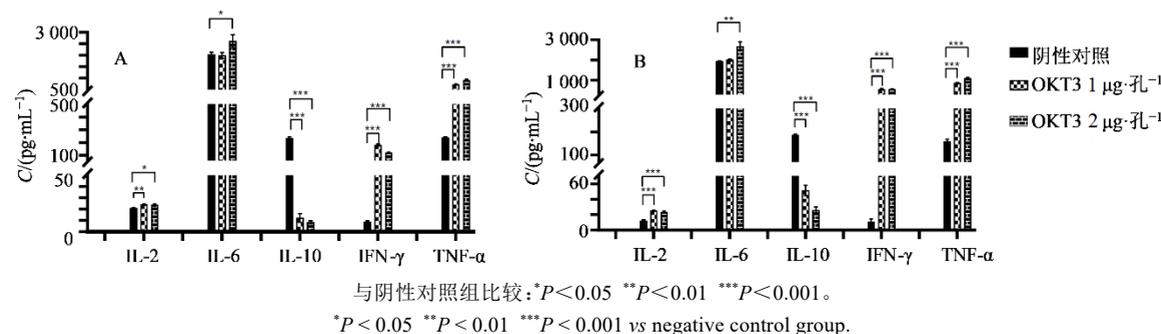


图5 液相法抗体包被48 h时, PBMC刺激24(A)、48(B) h细胞因子间的水平变化

Fig. 5 Antibody was coated for 48 h, PBMC stimulated level of different cytokines at 24 (A) and 48 (B) h

表6 刺激时间与细胞因子释放倍数关系(液相法)
Table 6 Relationship between stimulation time and cytokine release factor (Liquid phase method)

刺激时 间/h	刺激浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$)	释放倍数				
		IL-2	IL-6	IL-10	IFN- γ	TNF- α
24	1	1	1	0	20	3
	2	1	1	0	13	4
48	1	2	1	0	52	5
	2	2	1	0	52	7

量更高。组别上的含量变化趋势也证明固相干法检测的结果更科学、可靠,考虑到类似的生物分析方法,如ELISA亦将标志物以固相干法包被在酶标板中,可以减少或降低因保存方法、时限、运输等现实因素产生的结果不可控影响。因此固相干法孵育系统有显著的试验设计优势,且细胞因子浓度的显著升高有助于新药在诱发CRS上的评价。上述试验仅进行了阳性对照品的试验,并未加入对药物的考虑,因此免疫治疗类产品如单抗、基因产品、细胞产品、大分子化药等在非临床阶段进行CRA,药物的作用浓度及样本类型仍是1项需要商榷的重要内容,可结合临床拟用剂量、毒理学剂量或药效学剂量综合考虑设定,选择适用于药物的样本类型(外周血、血浆、细胞)。基于上述,免疫类药物在临床试验中应进行严格的细胞因子试验,常见的适用于批量细胞因子检测的方法包括MSD、CBA及本试验中的Luminex,试验类型不应仅限于动物试验,即使动物试验结果没有提示存在CRS的可能,详尽的临床观察或病理异常结果亦可作为进行CRA试验的依据。单抗类药物在进行临床前动物毒理试验时,药物的靶点在序列和结构上存在种属差异^[17],即使是非人灵长类动物(NHP),如TGN1412。着重注意靶细胞、靶细胞在动物模型中的表达情况及递呈作用,人源化转基因动物在非临床试验中极大地提供了毒理学数据支撑,但不可避免地存在种属差异的问题。因此无论是药效学试验亦或是毒理学试验,体外的CRA试验依然是识别、提示CRS的一种重要手段,解读提示存在严重免疫原性或免疫毒性的试验数据时,需充分考虑是否会在临床试验中产生CRS。综上,在进行药物非临床安全性评价毒理学试验中,试验系统的设置要充分且合理,需要考虑药物作用机制、药物作用靶点、测试系统中药物的存在方式、合适对照、细胞来源、刺激时间、多细胞因子检测最优组合以及样本量等多种因素,从而最终建立更加灵活、精准的

CRS预测平台。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王玉亮,王峰,耿洁. 细胞因子与细胞因子风暴[J]. 天津医药, 2020, 48(6): 494-499.
Wang Y L, Wang F, Geng J. Cytokine and cytokine storm [J]. Tianjin Med J, 2020, 48(6): 494-499.
- [2] 姚立腾,闵建平,苏海翔. 细胞因子在新型冠状病毒肺炎中的作用机制及其监测价值[J]. 甘肃医药, 2020, 39(2): 148-150, 157.
Yao L T, Min J P, Su H X. Mechanism of cytokines in COVID-19 and its monitoring value [J]. Gansu Med J, 2020, 39(2): 148-150, 157.
- [3] Fajgenbaum D C, June C H. Cytokine storm [J]. N Engl J Med, 2020, 383(23): 2255-2273.
- [4] Ceschi A, Noseda R, Palin K, et al. Immune checkpoint inhibitor-related cytokine release syndrome: Analysis of WHO global pharmacovigilance database [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 557.
- [5] Elsayed A, Pellegrino C, Plüss L, et al. Generation of a novel fully human non-superagonistic anti-CD28 antibody with efficient and safe T-cell co-stimulation properties [J]. MAbs, 2023, 15(1): 2220839.
- [6] Suntharalingam G, Perry M R, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412 [J]. N Engl J Med, 2006, 355(10): 1018-1028.
- [7] Au L, Fendler A, Shepherd S T C, et al. Cytokine release syndrome in a patient with colorectal cancer after vaccination with BNT162b2 [J]. Nat Med, 2021, 27: 1362-1366.
- [8] Lim L C, Koh L P, Tan P. Fatal cytokine release syndrome with chimeric anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in a 71-year-old patient with chronic lymphocytic leukemia [J]. J Clin Oncol, 1999, 17(6): 1962-1963.
- [9] Winkler U, Jensen M, Manzke O, et al. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8) [J]. Blood, 1999, 94(7): 2217-2224.
- [10] Grimaldi C, Finco D, Fort M M, et al. Cytokine release: A workshop proceedings on the state-of-the-science, current challenges and future directions [J]. Cytokine, 2016, 85: 101-108.
- [11] Vessillier S, Fort M, O'Donnell L, et al. Development of the first reference antibody panel for qualification and

- validation of cytokine release assay platforms - Report of an international collaborative study [J]. *Cytokine X*, 2020, 2(4): 100042.
- [12] 尉骁璐, 孙建华, 宫丽崑. 单抗诱发性细胞因子释放综合征和体外细胞因子释放实验的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(9): 1185-1189.
- Yu X L, Sun J H, Gong L K. Research development of cytokine release syndrome induced by monoclonal antibody and cytokine release assays *in vitro* [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2018, 34(9): 1185-1189.
- [13] 钱军, 周俊东, 邹志宏. 细胞因子释放综合征的发生机制和防治策略 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2015, 27(2): 135-138.
- Qian J, Zhou J D, Zou Z H. Mechanisms and treatment of cytokine release syndrome [J]. *Cancer Res Clin*, 2015, 27(2): 135-138.
- [14] 傅盈双, 李双星, 李路路, 等. CAR-T治疗诱导细胞因子释放综合征的机制及临床前安全性评价 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(3): 469-477.
- Fu Y S, Li S X, Li L L, et al. Mechanism and preclinical safety evaluation of cytokines release syndrome induced by CAR-T cell therapy [J]. *Drug Eval Res*, 2023, 46(3): 469-477.
- [15] Bugelski P J, Achuthanandam R, Capocasale R J, et al. Monoclonal antibody-induced cytokine-release syndrome [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2009, 5(5): 499-521.
- [16] Vidal J M, Kawabata T T, Thorpe R, et al. In vitro cytokine release assays for predicting cytokine release syndrome: The Current state-of-the-science. Report of a European Medicines Agency Workshop [J]. *Cytokine*, 2010, 51(2): 213-215.
- [17] 王慧敏, 闻镍, 王晓霞, 等. 蛋白多肽类药物和单抗药物免疫原性评价方法及研究进展 [J]. *中国医药生物技术*, 2021, 16(3): 251-255.
- Wang H M, Wen N, Wang X X, et al. Evaluation methods and research progresses of immunogenicity of protein and polypeptide drugs and monoclonal antibody drugs [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2021, 16(3): 251-255.

[责任编辑 兰新新]