



## Monoclonal antibodies with equal specificity to D-dimer and high-molecular-weight fibrin degradation products

Alexander E. Kogan<sup>a,b</sup>, Kadriya S. Mukharyamova<sup>a</sup>, Anastasia V. Bereznikova<sup>a,b</sup>, Vladimir L. Filatov<sup>a,b</sup>, Ekaterina V. Koshkina<sup>c</sup>, Marina N. Bloshchitsyna<sup>b</sup> and Alexey G. Katrukha<sup>a</sup>

Blood Coagulation and Fibrinolysis 2016, 27:542–550

**Keywords:** antibodies, fibrin degradation products, fibrin fragment D-dimer, specificity, thrombosis

<sup>a</sup>HyTest, Research Department, Turku, Finland, <sup>b</sup>Biochemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University and <sup>c</sup>Cardiology Department, City Hospital, Moscow, Russian Federation

Correspondence to Alexander E. Kogan, Room 129, Department of Biochemistry, Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russian Federation  
E-mail: kogan@hytest.fi

**Received** 3 May 2015 **Revised** 11 September 2015  
**Accepted** 26 September 2015

译：王楠 校对：奚苏静

### 等克识别D二聚体和高分子量纤维蛋白降解产物的单克隆抗体

#### 1.简介

在凝血过程中, 经酶促作用纤维蛋白原会转换为纤维蛋白, 随后纤维蛋白凝块又会降解为不同分子量的多种可溶性纤维蛋白碎片, 也就是所谓的纤维蛋白降解产物(FDPs)。D二聚体(D-dimer, DD)是最小的纤维蛋白降解产物, 分子量为180kDa。D二聚体相对稳定, 被认为是纤维蛋白降解的最终产物。

在临床实践中, DD检测主要用于排除深静脉血栓和肺栓塞, 以及评估终止抗凝治疗带来的静脉血栓风险。此外, 也有许多研究指出, DD的升高在肿瘤和心血管方面也具有病理学价值。

尽管DD检测已经应用于临床多年, 但是血浆DD的定量检测依然存在很多问题。其中, 最主要的问题莫过于不同厂家试剂之间检测结果的差异。据统计, 不同试剂检测结果之间的差异可达到20倍甚至更高。这提示不同试剂可能仅识别“某种特定的目标分析物”, 并且强调了解纤维蛋白降

解产物在不同疾病患者中的存在情况及试剂特异性的重要性。

纤维蛋白降解是多层级的, 在最终产物DD形成之前, 整个过程会形成很宽分子量范围的FDPs。最初, 研究认为血液中仅存在DD和碎片E及二者复合物DDE。然后, 20年前有研究者发现DIC患者中存在高分子纤维蛋白降解产物并且可以被DD抗体识别。如今, 研究普遍认为在外周循环中存在多种不同分子量的FDPs。因此对于试剂所检测的DD, 可以更广义地理解为不同分子量的FDPs的总量。

由此可见, 由于不同个体中FDPs与DD存在的比例均不同, 不同厂家试剂之间检测结果的差异可主要归结于不同试剂所使用的抗体的特异性差异。例如, A试剂所使用的抗体更倾向于识别高分子FDPs, 从而导致D二聚体量被高估; 而B试剂所使用的抗体更倾向于识别D二聚体, 从而导致了高分子FDPs的量被高估。这也是目前DD检测难以实现标准化的主要原因。

有研究建议使用DD升高的患者混合血浆作为参考物质。也有研究建议对不同试剂之间的结果使用转换系数，但是该方法也需要参考物质。ISTH Scientific和标准化委员会建议使用不同分子量的FDPs混合物作为参考物质。

而本研究认为，由于检测差异的根本原因在于抗体特异性，因此解决DD检测标准化的唯一方法是使用等克识别FDPs和DD的抗体。这也是本研究的主要目的，旨在开发可以等克识别FDPs和DD的单克隆抗体以推进DD检测标准化。

## 2.实验材料与方法：

### 2.1试剂\*。

2.2单克隆抗体的开发：标准杂交瘤细胞抗体生产技术（Sp2/O骨髓瘤细胞和经DD免疫的鼠Balb/c脾细胞），筛选方法为直接ELISA，确保与纤维蛋白原无交叉反应。

2.3荧光夹心免疫分析系统\*：采用时间分辨免疫荧光分析方法。

2.4等量交联物的FDP和DD的制备\*：通过蛋白酶水解纤维蛋白原进行制备。

2.5凝胶层析\*：DD、FDP、纤维蛋白原和病人样本的凝胶层析分析采用AKTA纯化系统（GE）。

2.6SDS-PAGE：DD和FDP采用3-10%梯度非还原性SDS-PAGE进行分析。

2.7患者：7例深静脉血栓患者、1例肠膜血栓患者、15例败血症患者、9例腹部外科手术患者和7例肺栓塞患者。其中，外科手术患者的采血时间为手术前一天和手术后一天。

2.8样本：样本为静脉血，EDTA抗凝血浆，保存条件为-70度。

\*详细信息请参见原文

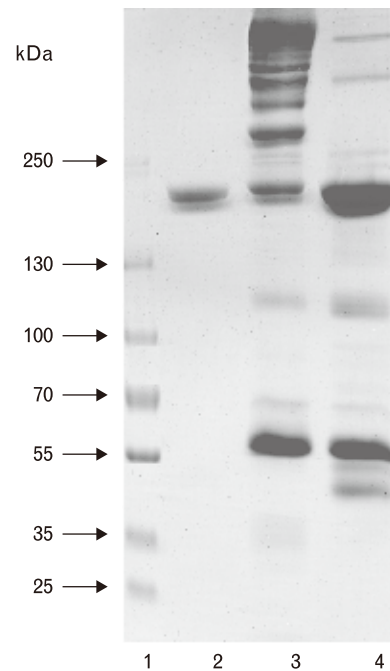
## 3.结果分析：

通过纤维蛋白凝块制备具有等量交联物的FDP和DD并进行凝胶电泳分析发现[Fig.1]，在FDP制备物中，主要为高分子量FDP和小部分DD；而在DD制备物中，主要为DD和小部分高分子量FDP。随着蛋白水解作用的延长，FDP的量逐步减少，而DD的量逐步加大，但总纤维蛋白交联物的量仍保持不变。

本研究制备并筛选了22株与纤维蛋白原没有交叉反应或者存在微弱反应的单克隆抗体。所有抗体均使用双抗体夹心免疫分析系统对FDP和DD的等量纤维蛋白交联物进行了

测试。其中大部分抗体组合（DD162—DD186，捕获抗体—检测抗体）更倾向识别FDP[Fig.2a]，同时也有一部分组合则更倾向识别DD，如DD143—DD195[Fig.2b]。在所有抗体组合中，仅有DD189—DD255可以对FDP和DD等克识别[Fig.2c]。

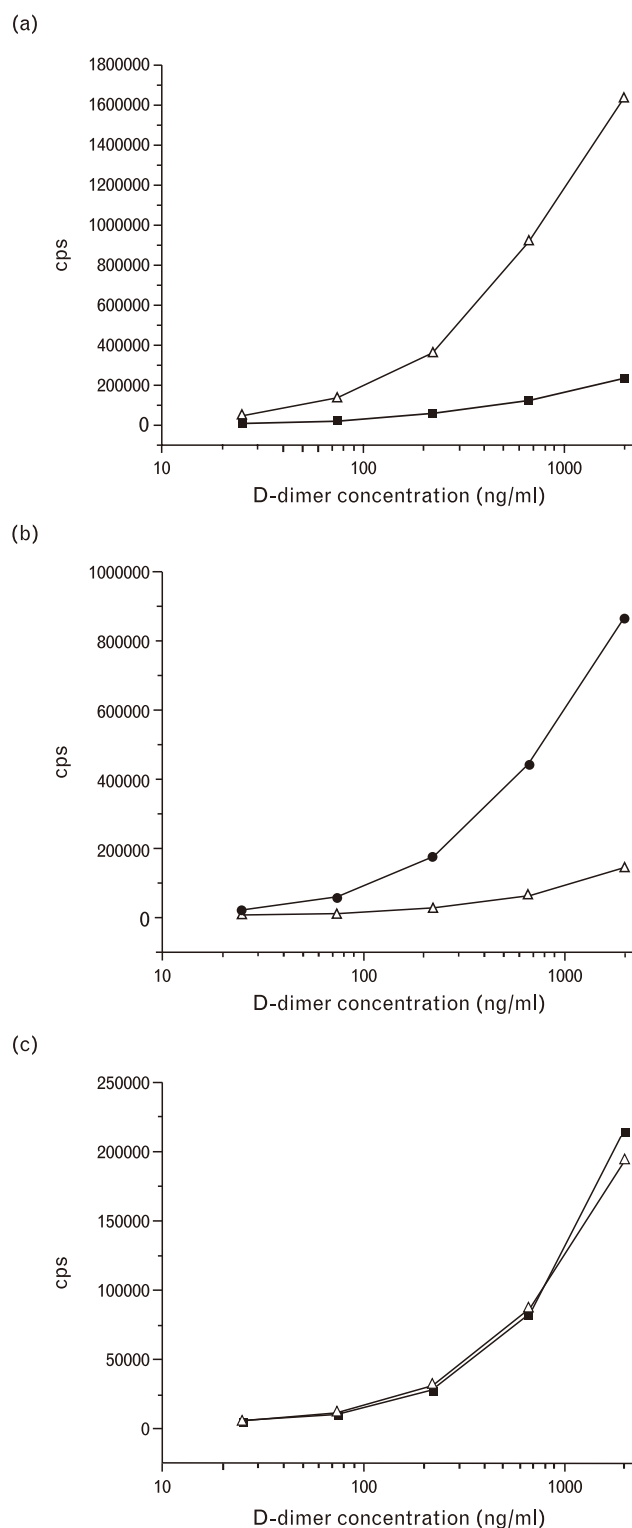
Fig. 1



SDS PAGE of FDP and D-dimer prepared sequentially from the same fibrin clot. 1, molecular weight standards; 2, D-dimer standard; 3, high-molecular-weight fibrin degradation product (HMW FDP) solution; 4, D-dimer prepared from HMW FDP solution.

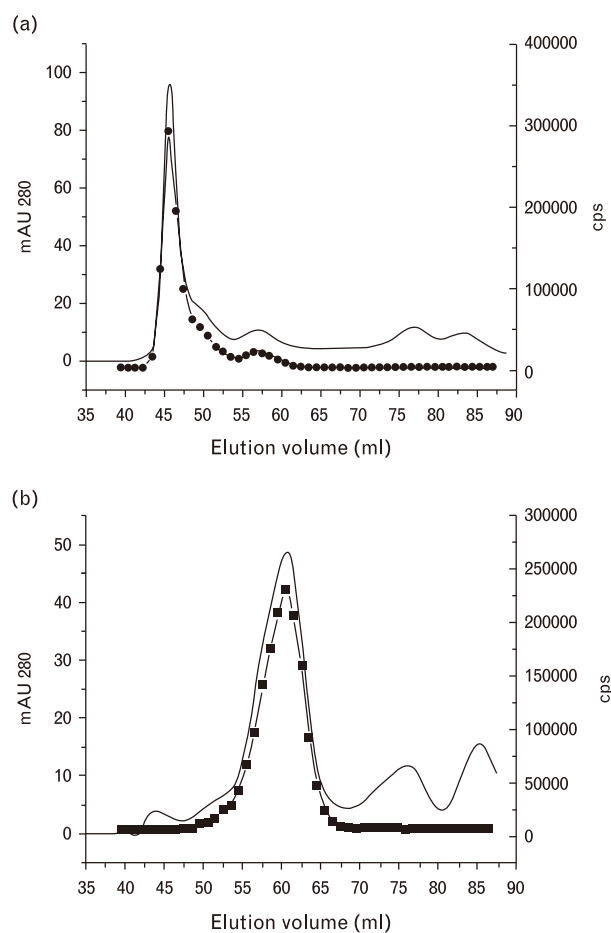
通过使用抗体对DD189—DD255分别对FDP和DD的凝胶层析产物分析后发现：（a）与FDP制备的SDS-PAGE结果类似，除FDP主峰外还存在若干小分子洗脱峰，其中便包括少量的DD洗脱峰；同时FDP和DD的OD280的洗脱峰与DD189—DD255免疫测定的峰值一致[Fig.3a]，这证明DD189—DD255可等克识别FDP与DD。（b）在DD产物的凝胶分析中没有高分子量FDP的存在，而是由低分子量的纤维蛋白降解产物组成，其中主峰为DD，其余的小分子峰值并不具有DD免疫活性[Fig.3b]。同时，DD产物中的DD主洗脱峰与FDP产物中的DD洗脱峰不一致，提示FDP制备产物中的DD可能是DDE复合物。因此可以得出结论——FDP和DD制备物的凝胶层析分析与SDS-PAGE结果[Fig.1]高度一致。

Fig. 2



Titration curves of D-dimer and fibrin degradation product (FDP) preparations in the DD162-DD186 (a), DD143-DD195 (b), and DD189-DD255 (c) assays. Empty triangles, FDP; black squares, D-dimer.

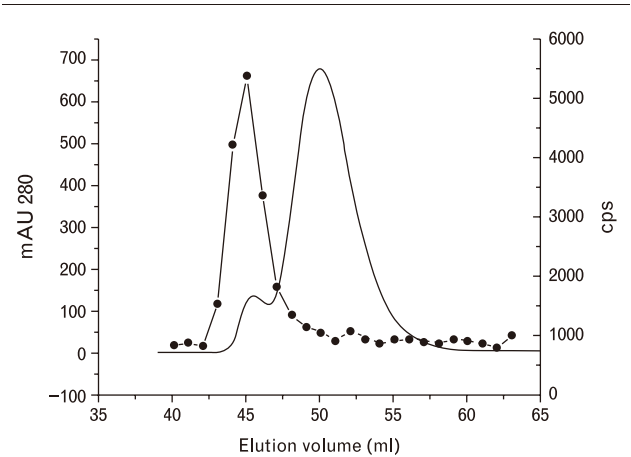
Fig. 3



Gel filtration of fibrin degradation product (a) and D-dimer (b) preparations. Solid line, mAU 280; black circles, immunological activity measured by the DD189-DD255 assay.

通过测试DD189—DD255及其他抗体组合与纤维蛋白原的反应性发现，交叉反应率约为0.5-5%。为了阐明DD189—DD255与纤维蛋白原的反应性，研究者对纤维蛋白原（纯度大于90%）进行了凝胶层析分析，同时用DD189—DD255对其进行免疫活性测定[Fig.4]。结果显示，凝胶层析产物存在两个洗脱峰，其中340KDa的主峰为纤维蛋白原，不具有DD免疫活性，而另一个较高分子量的洗脱峰具有DD活性，可被DD189—DD255识别。通过将Fig.4与Fig.3a对比发现，纤维蛋白原凝胶分析物中具有DD免疫活性的洗脱峰与FDP凝胶分析物中一致。说明纤维蛋白原中含有少量高分子量纤维蛋白降解产物，同时也证明DD189—DD255与纤维蛋白原无交叉反应。

Fig. 4



Gel filtration studies of human fibrinogen. Solid line, mAU 280; black circles, immunological activity measured by the DD189-DD255 assay.

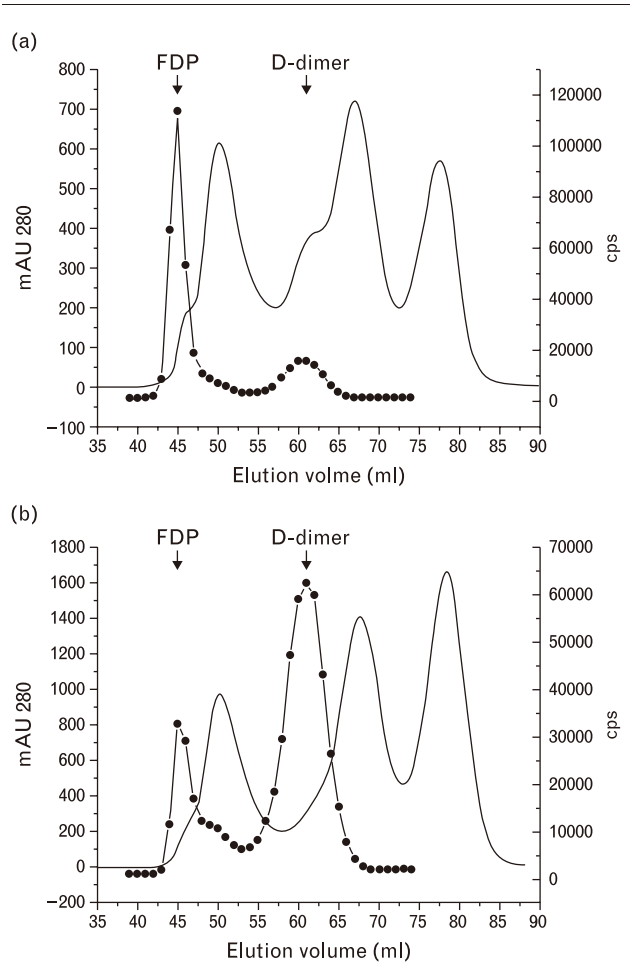
研究者进一步使用DD189—DD255对不同患者中的DD浓度进行了测定[Table 1], 结果显示, DD浓度在所有患者中均有显著升高。同时, 研究者将每组患者中具有最高DD浓度水平的样本进行了进一步的DD与FDP比例分析。

Table 1 Determination of D-dimer levels in plasma samples of patients with different diseases

| Disease                    | N  | DD, $\mu\text{g/ml}$ | Range, $\mu\text{g/ml}$ |
|----------------------------|----|----------------------|-------------------------|
| Sepsis                     | 15 | 2.5                  | 0.52–4.9                |
| Thrombosis                 | 8  | 3.1                  | 0.98–6.9                |
| The surgery (before/after) | 9  | 0.28/2.6             | 0.25–0.32/1.2–3.6       |
| Pulmonary thromboembolism  | 7  | 2.7                  | 1.3–6.7                 |

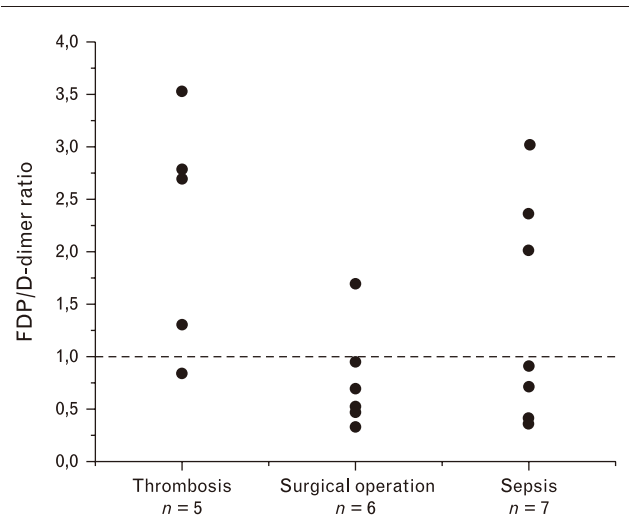
关于DD与FDP比例的分析, 本研究一共选取了18例样本 (5例血栓患者、6例手术随访患者及7例败血症患者) 分别进行了凝胶层析分析, 并用DD189—DD255进行了免疫活性分析。结果显示, 所有样本均存在FDP和DD两个洗脱峰。由于DD189—DD255可以等克识别FDP和DD, 洗脱峰面积比可视为FDP和DD的比例。结果发现, 在不同疾病患者中, FDP和DD的比例存在显著差异。如Fig.5所示, 在血栓患者中, FDP的浓度远远高于DD (最高可达3.5倍); 在败血症患者中, FDP浓度略高于DD; 而在手术后1天的患者中, DD的浓度则略高于FDP。更多关于不同疾病患者中FDP与DD的比例请参见Fig 6。

Fig. 5



Gel filtration study of plasma samples from patients with thrombosis (a) and one day after surgical operation (b). Solid line, mAU 280; black circles, immunological activity measured by the DD189-DD255 assay.

Fig. 6



Ratios of the fibrin degradation product to D-dimer levels in the blood of patients with different diseases measured by the DD189-DD255 assay.

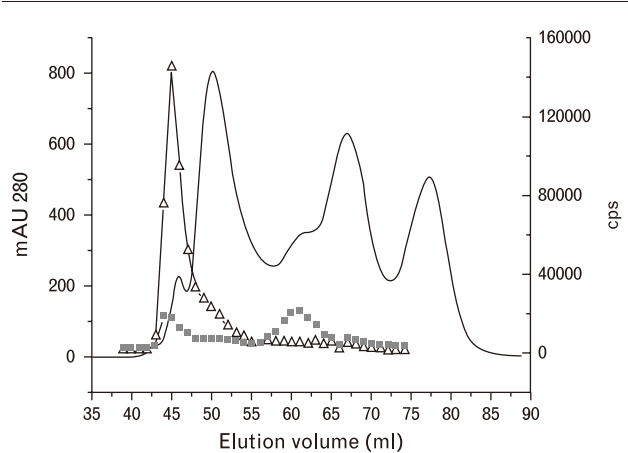
**Table 2 Comparison of D-dimer concentrations in the blood of representative patients with different diseases measured by D-dimer assays utilizing antibodies with different specificities**

| Patient diagnosis    | FDP/DD ratio measured by the DD189-DD255 assay | DD measured by the DD162-DD186 assay, µg/ml | DD measured by the DD189-DD255 assay, µg/ml |
|----------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Deep vein thrombosis | 2.7                                            | 420                                         | 4.8                                         |
| Deep vein thrombosis | 3.5                                            | >1000                                       | 6                                           |
| Surgical operation   | 0.32                                           | 65                                          | 3.3                                         |
| Sepsis               | 0.36                                           | 145                                         | 4.6                                         |

FDP, fibrin degradation product.

进一步，研究者又对不同特异性的其他抗体对组合测试FDP与DD的结果进行了分析。该研究中使用的抗体组合为更倾向识别FDP的DD162-DD186和更倾向识别DD的DD143-DD195。通过对一例败血症患者血浆凝胶层析产物的分析测定后发现，DD162-DD186仅能识别FDP洗脱峰，而DD143-DD195则更倾向识别DD洗脱峰[Fig 7]。该结果提示，由于不同患者中纤维蛋白交联物存在情况不同，当使用不同特异性抗体时很有可能会导致结果的高估或者低估。为了评估不同特异性抗体对检测结果影响的程度，研究者使用DD189-DD255和DD162-DD186进行了样本测试比对[Table 2]。两组测试均使用了商业化DD校准品进行校准。FDP在深静脉血栓患者中普遍存在，当使用对FDP极为敏感而对DD不敏感的 DD162-DD186进行测试时，会得出极限高值的“DD”结果。而使用DD162-DD186对DD普遍存在的外科手术和败血症患者血浆时，所测得的“DD”浓度则远低于血栓患者。而使用DD189-DD255所测试结果则显著低于DD162-DD186的测试结果。

**Fig. 7**



**4.启示与讨论：**

尽管D-dimer检测已经应用于临床多年，然而我们传统认知的“DD”检测其实并非仅单纯的D二聚体，而是不同分子量的纤维蛋白降解产物的总和。由于不同厂家使用的抗体的特异性不同，另一方面不同患者体内存在纤维蛋白降解产物也有所不同，因此造成了不同试剂厂家之间检测结果的差异。这也是目前DD检测标准化难以实现的主要原因。

根据本篇研究的成果，在未来最可能实现DD标准化的方法只有使用等克识别DD和FDP的单克隆抗体。在本研究中，研究者使用传统的单克隆抗体生产技术生产出识别DD和FDP的抗体，然后采用了一种新颖的抗体筛选方法成功获得了一对等克识别DD和FDP的单克隆抗体。该方法可简述为：通过制备含有等量纤维蛋白交联物的FDP和DD，然后用不同抗体组合对FDP和DD制备物进行测定并筛选，测试FDP和DD信号值一致的即为目标抗体。

因为血液中存在大量纤维蛋白原，为了保证DD检测结果的准确性，抗体不能与纤维蛋白原存在交叉反应。先前的研究表明，本研究大部分抗体均与纤维蛋白原存在一定的交叉反应。但经后续分析验证得出，实验中所使用的纤维蛋白原含有一定量的高分子FDP，从而导致了反应信号的产生。因此，可得出结论，本研究所制备的等克识别FDP和DD的单克隆抗体DD189-DD255与纤维蛋白原无交叉反应。

由于DD189-DD255可以等克识别FDP和DD，因此本研究提出了使用该抗体组合可以对不同患者样本中不同形式的“DD”的比例进行分析的假设。通过对不同患者血浆进行凝胶层析分析并用DD189-DD255进行免疫活性测定后发现，纤维蛋白降解产物的存在情况在不同疾病患者有显著差异，甚至在相同疾病的不同患者中也存在一定差异。尽管该研究所使用的样本量并不足以做出常规性结论，但我们依然能从中看到一些趋势。首先，FDP在深静脉血栓患者血液中

大含量远高于DD（最高可达3.5倍）。其次，在败血症和经历外科手术的患者中，FDP和DD的量相当。此外，在一些外科患者中，DD的量要远高于FDP。

因此，以上研究充分说明抗体特异性对DD检测结果的影响至关重要。研究者进一步使用了不同特异性的抗体配对进行了样本测试比对。结果显示，不同特异性抗体配对的测试结果存在显著差异。同时，在本实验中研究者使用了统一的商业化DD标准品进行校准，结果显示使用统一的校准品对于改善测试差异并无显著效果。这也进一步说明，在未来唯一可能实现DD检测标准化的方法只有使用等克识别DD和FDP的抗体配对。