

生物检定

SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)体外相对效力 双抗体夹心 ELISA 检测方法建立与验证*

曹莎莎¹, 何鹏², 刘晓雅¹, 刘莹¹, 刘宇¹, 马志桃¹, 韦芬¹, 王佳霁^{1**}, 胡忠玉^{2**}

(1. 安徽智飞龙科马生物制药有限公司, 合肥 230088; 2. 中国食品药品检定研究院 药品监管科学全国重点实验室
国家卫生健康委生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室 国家药品监督管理局生物制品
质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

摘要 目的: 建立严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型(SARS-CoV-2)重组蛋白疫苗(CHO 细胞)体外相对效力的双抗体夹心 ELISA 检测方法, 并进行验证。方法: 采用基因重组技术制备抗 SARS-CoV-2 刺突蛋白受体结合区(receptor binding domain, RBD)的人源单克隆抗体 GH4 及 CB6。以 GH4 为包被抗体, HRP 标记的 CB6(CB6-HRP)为检测抗体, 建立双抗体夹心 ELISA 法, 考察 GH4 和 CB6-HRP 的适宜工作浓度。开展方法学验证, 验证项目为线性与范围、专属性、精密性(重复性、中间精密性)、准确度和耐用性。采用建立的方法检测 3 批工艺验证批及 22 批持续工艺确认批 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)的体外相对效力。结果: GH4 及 CB6-HRP 的适宜工作浓度分别为 $1\ 000\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $31.25\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。疫苗参考品质量浓度在 $0.312\ 5\sim 5\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与 A_{450} 呈良好的对数线性关系, 回归方程斜率均在 0.80~1.25 范围内, R^2 均 > 0.99 ; 建立的方法可特异性检测 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞), 与 MERS 重组蛋白疫苗、流感病毒疫苗、狂犬病毒疫苗及 CHO 宿主细胞蛋白等均无交叉反应; 精密性验证时, 重复性的几何变异系数(geometric coefficient of variation, GCV)分布在 1.6%~2.4% 范围内, 中间精密性的 GCV 在 1.2%~2.6% 范围内; 准确度验证时, 回归方程 R^2 为 0.994 5, 斜率为 0.999 5 在 0.80~1.25 范围内, 相对偏倚(relative bias, RB)分布在 -4.04%~7.36% 范围内; 耐用性验证中, 不同考察条件下体外相对效力测定值在 0.96~1.08 范围内。3 批工艺验证批 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)体外相对效力均值为 1.02, GCV 为 4.8%; 22 批持续工艺确认批 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)体外相对效力在 0.81~1.23 范围内, 几何均值为 1.04, GCV 为 4.4%。结论: 建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法具有良好的特异性、精密性、准确度及耐受性, 可用于 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)体外相对效力检测及质量控制。
关键词: 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型; 重组蛋白疫苗; 酶联免疫吸附法; 双抗体夹心法; 体外相对效力

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2025)03-0452-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-1276

* “十四五”重点研发专项“基于颗粒型佐剂的疫苗精准组装、递送及质量标准”课题项目(2021YFC2302600)

** 通信作者 王佳霁 Tel:(0551)65313395; E-mail: wangjiayi@zhifeishengwu.com

胡忠玉 Tel:(010)53851772; E-mail: huzhy@nifdc.org.cn

第一作者 曹莎莎 Tel: 15665407781; E-mail: caoshasha@zhifeishengwu.com

何鹏 Tel: 13488768461; E-mail: hepeng9553@163.com

Establishment and validation of a double antibody sandwich ELISA method for the *in vitro* relative potency test of recombinant SARS-CoV-2 vaccine (CHO cells)*

CAO Sha-sha¹, HE Peng², LIU Xiao-ya¹, LIU Ying¹, LIU Yu¹, MA Zhi-tao¹,
WEI Fen¹, WANG Jia-ji^{1**}, HU Zhong-yu^{2**}

(1. Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical Co, Ltd., Hefei 230088, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To establish and validate a double antibody sandwich ELISA method for the *in vitro* relative potency test of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, (SARS-CoV-2) recombinant protein vaccine (CHO cells). **Methods:** Human monoclonal antibodies GH4 and CB6 against the receptor binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 spike protein were prepared by genetic recombinant technology. A double antibody sandwich ELISA method was established using GH4 as coating antibody and CB6 labeled with HRP enzyme (CB6-HRP) as detection antibody. The working concentrations of GH4 and CB6-HRP were determined. Methodological validation was carried out, including linearity and range, specificity, precision (repeatability, intermediate precision), accuracy, and robustness. The established method was used to detect the *in vitro* relative potencies of three batches of process-validated and twenty-two batches of continuous process verification of SARS-CoV-2 recombinant protein vaccines (CHO cells). **Results:** The optimal working concentrations of GH4 and CB6-HRP were $1\ 000\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $31.25\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The vaccine reference had a good log-linear relationship with A_{450} in the concentration range of $0.312\ 5\text{--}5\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the slopes of the regression equations were all in the range of 0.80–1.25 and the R^2 values were all > 0.99 . The established method could specifically detect the SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine (CHO cells), and there was no cross-reactivity with the MERS Vaccine (CHO cells), influenza virus vaccine, rabies virus vaccine and CHO host cell proteins. For precision validation, the geometric coefficient of variation (GCV) of repeatability was in the range of 1.6% to 2.4%, and the GCV of intermediate precision was in the range of 1.2% to 2.6%. The R^2 value of the regression equation was 0.994 5, and the slope was 0.999 5 which was in the range of 0.80–1.25. For accuracy validation, the relative bias (RB) was in the range of -4.04% to 7.36%. In the robustness validation, the *in vitro* relative potency under different test conditions ranged from 0.96 to 1.08. The geometric mean *in vitro* relative potency of the three batches of process-validated SARS-CoV-2 recombinant protein vaccines (CHO cell) was 1.02, with an GCV of 4.8%; the geometric mean *in vitro* relative potency of twenty-two batches of continuous process verification SARS-CoV-2 recombinant protein vaccines (CHO cells) was 1.04, with an GCV of 4.4%. **Conclusion:** The established double antibody sandwich ELISA method has good specificity, precision, accuracy and robustness. It can be used for the detection of the *in vitro* relative potency and the quality control of SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine (CHO cells).

Keywords: SARS-CoV-2; recombinant protein vaccine; ELISA; double antibody sandwich method; *in vitro* relative potency

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 引起的新型冠状病毒感染 (简称新冠肺炎), WHO 将由该病毒引起的疾病正式命名为“2019 冠状病毒病”

(coronavirus disease 2019, COVID-19)^[1],席卷全球的新冠疫情给全人类的生命健康安全带来巨大威胁,传播速度快感染率高是其典型特点^[2]。接种新冠疫苗是防控新冠最有效和最经济的手段^[2-3]。截至2023年12月31日,全球已接种疫苗超过130亿剂,约70%的总人口至少接种了一剂新冠疫苗^[4]。为确保新冠疫苗接种的保护效果,保证疫苗有效性和一致性的质量控制尤为重要^[5]。

SARS-CoV-2主要通过刺突蛋白(spike protein, SP)与其受体——位于呼吸道上皮细胞表面的血管紧张素转换酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE 2)结合而感染人体^[6-7],受体结合区(receptor-binding domain, RBD)是S蛋白与ACE 2结合的关键位点,也是诱导中和抗体产生的主要结构域^[8-9]。SARS-CoV-2重组蛋白疫苗(CHO细胞)是将SARS-CoV-2 S蛋白的RBD基因重组到中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)内,在体外表达形成RBD二聚体,并添加氢氧化铝佐剂以提高免疫原性^[10-12]。效力是评价疫苗有效性与批间一致性的关键指标,对疫苗需建立体外相对效力及体内效力的质量标准和适宜的检测方法^[13]。但体内效力方法周期过长,实验结果波动大,且存在动物伦理方面的限制,给企业出厂放行与监管机构批签发带来诸多不便^[14];而体外方法结果较为稳定,可反映出一些体内方法无法观察到的工艺变化,在生产一致性监测方面优于体内方法,作为体内方法的有益补充,可更有效地评估工艺变化的影响^[13]。本研究参考2020年版《中华人民共和国药典》四部通则3501重组乙型肝炎疫苗(酵母)体外相对效力检查法^[15],采用SARS-CoV-2 RBD蛋白特异性人源单克隆中和抗体GH4和CB6,建立用于SARS-CoV-2重组蛋白疫苗(CHO细胞)体外相对效力检测的双抗体夹心ELISA法,并进行方法验证,以期为该疫苗的质量控制提供保障。

1 材料与方法

1.1 疫苗及参考品

含铝佐剂疫苗: MERS重组蛋白疫苗(CHO细胞),蛋白质含量每剂25 μg; 3批工艺验证批及22批持续工艺确认批SARS-CoV-2重组蛋白疫苗(CHO细胞),蛋白质含量为每剂25 μg; SARS-CoV-2重组蛋白疫苗(CHO细胞)参考品(简称疫苗参考品,蛋白质含量为每剂25 μg); 不含铝佐剂疫苗: 四价流感病毒裂解疫苗,抗原含量为每剂30 μg; 冻干人用狂犬病疫苗(MRC-5细胞),抗原含量为每剂14.34 U。以上疫苗均

由安徽智飞龙科马生物制药有限公司制备及保存。

1.2 主要试剂与仪器

GH4人源单克隆抗体、HRP标记的CB6人源单克隆抗体(CB6-HRP)均来自中国微生物研究所; PBS及PBST、牛血清白蛋白、二乙醇胺、Triton X-100、TMB单组分显色液、终止液均购自北京索莱宝科技有限公司; 脱脂奶粉购自生工生物工程(上海)股份有限公司; CHO细胞宿主蛋白、佐剂来自安徽智飞龙科马生物制药有限公司。

Spectra Max M5型酶标仪、Aqua Max 2000型洗板机均为Molecular Devices产品; DK-8D型三孔电热恒温水槽、CU-600型电热恒温水槽均购自上海一恒科学仪器有限公司; HYC-390型医用冷藏箱购自青岛海尔生物医疗股份有限公司; MS 3 digital 涡旋混合器购自IKA公司。

1.3 方法的建立

用PBS稀释GH4人源单克隆抗体至 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,加入96孔板,每孔100 μL, 2~8 °C包被过夜; 用PBST洗涤3次,每孔300 μL; 每孔加200 μL含3%脱脂奶粉的PBS于37 °C封闭2 h; 用PBST洗涤3次,每孔300 μL; 用100 μL处理液(含2.5%二乙醇胺和2%Triton X-100的PBS)分别将100 μL供试品及疫苗参考品37 °C解吸附30 min; 用稀释液(含1%牛血清白蛋白的PBS)将供试品及疫苗参考品2倍系列稀释为不同浓度供试品溶液及疫苗参考品溶液,以每孔100 μL加至酶标板中,37 °C孵育2 h; 用PBST洗涤3次,每孔300 μL; 每孔加入CB6-HRP 100 μL, 37 °C孵育1 h; 用PBST洗涤5次,每孔300 μL; 每孔加入TMB单组分显色液100 μL, 37 °C显色5 min后每孔加0.5 M稀硫酸终止液100 μL; 用酶标仪检测 A_{450} 。双平行线法计算抗原含量^[16-17],疫苗与疫苗参考品抗原含量比值即为其体外相对效力。

1.4 GH4及CB6-HRP工作浓度确定

采用棋盘滴定法,用PBS将包被抗体GH4稀释至2 000、1 000、500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,用含1%脱脂奶粉的PBS缓冲液将检测抗体CB6-HRP自250 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 2倍系列稀释至7.812 5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,按“1.3”项方法检测 A_{450} ,同时设阳性对照(P,疫苗参考品)及阴性对照(N,含1%牛血清白蛋白的PBS),计算 A_P 与 A_N 的 A_{450} 比值(A_P/A_N),选择包被抗体GH4达到饱和作用浓度时, A_P/A_N 最大时对应的检测抗体浓度为最适工作浓度组合。

1.5 标准曲线的建立及确定

1.5.1 标准曲线的建立 用稀释液将疫苗参考品稀释至 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 再 2 倍系列稀释至 $0.156 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 共 8 个浓度, 采用建立的方法进行检测。以疫苗参考品浓度的对数为横坐标, 各浓度下 A_{450} 的对数为纵坐标, 进行线性回归, 拟合的标准曲线应具有良好线性, R^2 应 > 0.99 , 标准曲线应不少于 5 个浓度点。

1.5.2 标准曲线的确定 用稀释液将疫苗参考品稀释至“1.5.1”项方法初步确定的浓度范围, 采用建立的方法进行检测。以疫苗参考品浓度的对数为横坐标, 各浓度下 A_{450} 的对数为纵坐标, 进行线性回归, 标准曲线 R^2 应 > 0.99 。

1.6 分析方法验证

1.6.1 线性与范围 取疫苗参考品用稀释液进行 2 倍系列稀释, 制备质量浓度为 $0.312 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的参考品溶液, 采用建立的方法进行 6 次独立检测。以疫苗参考品浓度的对数为横坐标, 各浓度下 A_{450} 的对数为纵坐标, 进行线性回归, 计算回归方程斜率及 R^2 。

1.6.2 专属性 取含铝佐剂供试品: 疫苗参考品、SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗 (CHO 细胞)、MERS 重组蛋白疫苗 (CHO 细胞) 使用“1.3”项处理液解吸附后, 采用建立的方法检测。取不含铝佐剂供试品: CHO 宿主细胞蛋白、四价流感病毒裂解疫苗、冻干人用狂犬病疫苗 (MRC-5 细胞) 以及与被测疫苗中同质的佐剂不使用处理液解吸附, 使用“1.3”项直接采用建立的方法检测。以稀释液为阴性对照, 阴性对照检测结果的 2.1 倍作为 Cut-off 值, 将疫苗参考品等 A_{450} 与 Cut-off 值比较, \geq Cut-off 值的结果判为阳性, $<$ Cut-off 值的结果判为阴性。

1.6.3 精密度 重复性验证: 取疫苗参考品用稀释液进行 2 倍系列稀释, 制备在对数尺度上呈均匀间隔的理论效力水平为 156% ($0.487 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、125% ($0.390 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、100% ($0.312 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、80% ($0.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、64% ($0.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 5 套参考品溶液。每个水平参考品溶液独立测定 6 份, 以理论效力水平为 100% 的系列参考品溶液为基准, 计算其他 4 套参考品溶液的相对效力值和 GCV。

中间精密度验证: 按“1.6.3”重复性验证项方法制备 5 套参考品溶液, 由 3 名实验员分别在不同天进行测定, 每次试验独立测定 2 份, 每次以 2 份结果的

几何均值作为报告值。以理论效力水平为 100% 的系列参考品溶液为基准, 计算其他 4 套参考品溶液的相对效力值和 GCV。

1.6.4 准确度 按“1.6.3”重复性验证项方法制备 5 套参考品溶液, 由 3 名实验员分别在不同天进行测定, 每次试验独立测定 2 份, 每次以 2 份结果的几何均值作为报告值。以理论效力理论值的对数 (横坐标) 对其相应的效力测定值的对数 (纵坐标) 作直线回归, 计算回归方程斜率及 R^2 , 并按下式计算相对偏倚:

$$\text{相对偏倚} = \left(\frac{\text{相对效力测定值}}{\text{相对效力理论值}} - 1 \right) \times 100\%$$

1.6.5 耐用性 取疫苗参考品于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 解吸附 25、30、35 min 与显色 3、5、7 min 组合, 制备理论效力水平为 100% ($0.312 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的系列参考品溶液。以 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 解吸附 30 min、显色 5 min 为对照条件, 计算各考察条件下体外相对效力。

1.7 方法的应用

用建立的方法检测 3 批工艺验证批及 22 批持续工艺确认批 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗 (CHO 细胞), 并计算几何均值及 GCV。

1.8 数据采集及分析

应用酶标仪 SoftMax Pro 7.1.1 软件采集数据, Combistats 7.0 软件进行双平行线分析, GraphPad 8.0.2 软件进行做图。

2 结果

2.1 最适 GH4 及 CB6-HRP 工作浓度

GH4 抗体在 $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 工作浓度时, 该抗体作用达到饱和, 进一步升高其浓度至 $2000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, A_P/A_N 未见明显提高; 在此条件下, CB6-HRP 为 $31.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, A_P/A_N 最高。不同抗体浓度组合条件下的 A_{450} 见图 1。

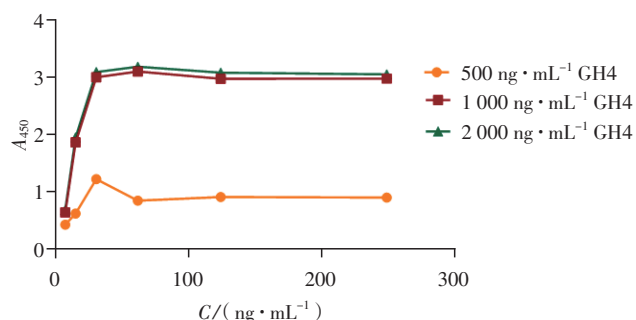


图 1 不同抗体浓度组合条件下的 A_{450}

Fig. 1 A_{450} at different combinations of antibody concentrations

2.2 标准曲线的建立及确定

2.2.1 标准曲线的建立 采用线性回归拟合,质量浓度为 20~0.156 25 ng · mL⁻¹ 的参考品溶液线性较好的范围为 5~0.312 5 ng · mL⁻¹,线性方程为:

$$Y=0.896\ 9X-0.691\ 1, R^2=0.995\ 4$$

初步确定后续试验标准曲线共 5 个浓度,分别为 5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 ng mL⁻¹,范围在 5~0.312 5 ng mL⁻¹。

2.2.2 标准曲线的确定 采用线性回归拟合,质量浓度为 5~0.312 5 ng · mL⁻¹ 的参考品溶液线性良好,线性方程为:

$$Y=0.939\ 6X-0.714\ 9, R^2=0.990\ 4。$$

确定后续试验标准曲线共 5 个浓度,分别为 5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 ng mL⁻¹,范围在 5~0.312 5 ng mL⁻¹。

2.3 方法的验证

2.3.1 线性与范围 第 1~6 次独立试验 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗参考品标准曲线的 R² 分别为 1.000、0.999、1.000、0.998、0.999、1.000,斜率分别为 0.993 5、1.086 6、0.999 4、0.917 7、1.098 7、1.011 2。取 6 次试验均值拟合回归方程为:

$$Y=1.022\ 8X-0.720\ 7, R^2=0.999\ 8$$

斜率为 1.022 8,在 0.80~1.25 之间。

2.3.2 专属性 建立的方法检测 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗参考品及 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗的 A₄₅₀ 均高于 Cut-off 值,检测 MERS 重组蛋白疫苗、流感病毒疫苗、狂犬病疫苗及 CHO 宿主细胞蛋白等样品的 A₄₅₀ 均低于 Cut-off 值,未发现交叉反应,见图 2。

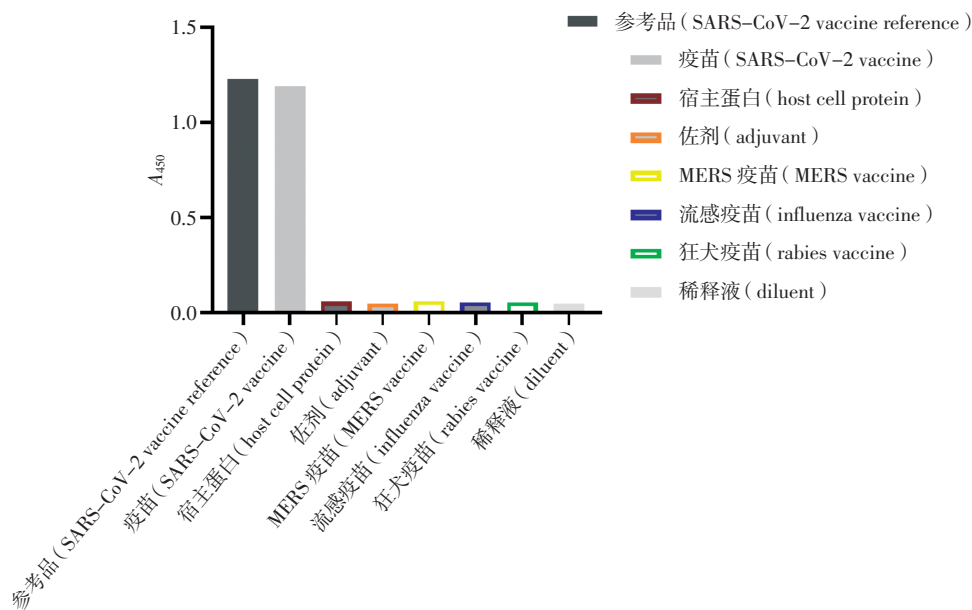


图 2 专属性验证结果
Fig. 2 Specificity verification result

2.3.3 精密度 重复性验证:不同水平相对效力测定值的几何均值与理论相对效力的差值在 ± 20% 以内,且不同水平理论效力测定值 GCV 分布在 1.6%~2.4% 范围内,具体结果见表 1。

中间精密度验证:不同水平相对效力测定值的几何均值与理论相对效力的差值在 ± 20% 以内,且不同水平理论效力测定值 GCV 分布在 1.2%~2.6% 范围内,结果见表 2。

2.3.4 准确度 以相对效力测定值的对数对其相应的相对效力理论值的对数作直线回归,回归方程为:

$$Y=0.999\ 5X-0.006, R^2=0.994\ 5$$

斜率为 0.999 5,在 0.80~1.25。

每个水平相对效力测定值均在 95% 置信区间上下限范围内,每个水平相对效力测定值的相对偏倚分布在 -4.04%~7.36% 范围内,见表 3。

2.3.5 耐用性 疫苗参考品于 37 °C 解吸附 25、30、35 min 与显色 3、5、7 min 组合,以 37 °C 解吸附 30 min、显色 5 min 为对照条件,各考察条件体外相对效力分布在 0.96~1.08 范围内,几何均值为 1.02, GCV 为 4.2%。见表 4。

表 1 重复性验证结果

Tab. 1 Repeatability verification results

理论相对效力水平 (theoretical relative potency level)/%	理论相对效价水平测定值 (theoretical relative potency level measurement value)/%						几何均值 (geometric mean)/%	GCV/ %
	1次 (test 1)	2次 (test 2)	3次 (test 3)	4次 (test 4)	5次 (test 5)	6次 (test 6)		
64	68	67	59	61	63	64	63.6	2.4
80	81	81	78	84	85	77	80.9	1.7
125	123	132	119	128	125	122	124.7	1.6
156	153	161	158	146	160	155	155.4	1.6

表 2 中间精密度验证结果

Tab. 2 Intermediate precision verification results

理论相对效力水平 (theoretical relative potency level)/%	时间									几何均值 (geometric mean)/%	GCV/ %
	时间 1 (time 1)			时间 2 (time 2)			时间 3 (time 3)				
	人员 1 (personnel 1)	人员 2 (personnel 2)	人员 3 (personnel 3)	人员 1 (personnel 1)	人员 2 (personnel 2)	人员 3 (personnel 3)	人员 1 (personnel 1)	人员 2 (personnel 2)	人员 3 (personnel 3)		
64	64	63	61	66	57	58	64	69	63	62.7	2.6
80	85	77	80	83	86	78	81	82	83	81.6	1.6
125	129	123	126	121	125	132	122	119	120	124.0	1.2
156	156	161	155	151	160	153	157	148	155	155.1	1.2

表 3 准确度验证结果

Tab. 3 Accuracy verification results

理论相对效力水平 (theoretical relative potency level)/%	试验次数 (number of experiment)	相对效力测定值 (relative effectiveness measurement value)/%			相对偏倚 (relative bias)/%		
		平均值 (average value)	置信下限 (lower confidence limit)	置信上限 (upper confidence limit)	平均值 (average value)	置信下限 (lower confidence limit)	置信上限 (upper confidence limit)
80	9	81.7	79.4	83.9	1.67	-0.60	3.93
125	9	124.1	120.9	127.4	4.11	0.86	7.36
156	9	155.1	152.0	158.2	-0.89	-3.98	2.21

表 4 耐用性验证结果

Tab. 4 Robustness verification results

解吸附时间 (desorption time)/min	体外相对效力 (in vitro relative potency)			几何均值 (geometric mean)	GCV/%
	显色 3 min (color development for 3 min)	显色 5 min (color development for 5 min)	显色 7 min (color development for 7 min)		
	25	0.96	0.97		
30	1.01	1.00	1.03		
35	1.04	1.08	1.02		

2.4 方法的应用

3批工艺验证批 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗 (CHO 细胞) 体外相对效力分别为 0.98、1.00、1.07, 几何均值为 1.02, GCV 为 4.8%。22 批持续工艺确认批

SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗 (CHO 细胞) 体外相对效力在 0.81~1.23 范围内, 几何均值为 1.04, GCV 为 4.4%。

3 讨论

自 2019 年底至 2024 年 11 月底, SARS-CoV-2

导致全球近 8 亿人感染,超 700 余万人死亡^[18],造成了巨大社会影响和经济损失。目前,接种疫苗仍是防控 SARS-CoV-2 感染的有效手段^[19]。SARS-CoV-2 结构中的 S 蛋白是感染人体细胞的关键蛋白,其可以结合机体细胞上的 ACE 2 受体^[20]。建立针对 S 蛋白疫苗的体外相对效力检测体系对于疫苗质控有重要意义^[21]。安徽智飞龙科马与中国科学院微生物研究所高福院士团队研发的 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)(原型株)已经在国内附条件上市^[22],但其体外相对效力检测尚无市售的 ELISA 试剂盒可供使用,为确保疫苗质量,本研究建立了基于 S 蛋白 RBD 的 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)体外相对效力检测方法。本研究选用了 2 株人源单克隆抗体 GH4 和 CB6,且 CB6 单抗是一款靶向 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 的抗体,于 2021 年 2 月与 SARS-CoV-2 S 蛋白抑制剂联合用药获 FDA 紧急使用授权^[23-24]。研究显示 2 株人源单克隆抗体 GH4 和 CB6 均具有较高的中和活性;经流式细胞技术证实均可阻断 RBD 与 ACE 2 的结合;并利用生物层干涉法证实二者特异性结合于 SARS-CoV-2 RBD 蛋白的不同表位,存在不完全竞争关系^[25-26],因此该抗体适用于建立双抗体夹心 ELISA 方法。GH4 和 CB6 这 2 株抗体均具有中和活性,当 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)在蛋白高级结构发生变化时能被检测出异常,表明这 2 株抗体可有效地监测工艺稳定性。目前,SARS-CoV-2 已出现多种变异株,研制针对变异株开发多价广谱苗成为趋势。这 2 株抗体可识别变异株疫苗抗原,已被用于 Omicron-Delta 株及 Omicron BA.4/5-Delta 株疫苗体外相对效力评价,表明这 2 株抗体对于新冠原型株及变异株的检测具备通用性。但这 2 株抗体无法区分原型株与变异株的抗原,表明在鉴别多价广谱苗抗原时应采用可区分原型株与变异株的抗体。

本研究基于传统的双抗体夹心 ELISA 法建立了 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)体外相对效力检测方法,首先通过棋盘滴定法确定人源单克隆抗体 GH4 和 CB6 的最适工作浓度分别为 1 000 和 31.25 ng·mL⁻¹,其次确定线性拟合标准曲线的浓度点为 5、2.5、1.25、0.625 及 0.312 5 ng·mL⁻¹,并对建立的检测方法进行了线性与范围、专属性、精密度、准确度和耐用性验证。验证结果表明,在 0.312 5~5 ng·mL⁻¹ 范围内,疫苗参考品质量浓度与 A₄₅₀ 呈良好的对数

线性关系,6 次独立试验标准曲线斜率在 0.80~1.25 范围内,R² 均> 0.99;专属性验证结果提示,该方法可特异性检测 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞),与 MRES 重组蛋白疫苗、流感病毒疫苗、狂犬病疫苗及 CHO 宿主细胞蛋白等均无交叉反应。验证重复性与中间精密度时,不同水平相对效力几何均值与理论值差异在 ±20% 以内,表明准确度较好;且不同水平相对效力测定值的 GCV 均< 20%,表明方法不受人员及检测时间的影响,精密度良好;验证准确度时,回归方程 R² 为 0.994 5,斜率为 0.999 5(在 0.80~1.25 范围内),相对偏倚分布在 -4.04%~7.36% 范围内,表明方法具有良好的准确度;耐用性验证结果显示,解吸附及显色时间的微小波动不会干扰检测结果,表明方法有良好的耐受性。采用该方法对 3 批工艺验证批及 22 批持续工艺确认批 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)进行体外相对效力检测,工艺验证批几何均值为 1.02,GCV 为 4.8%;持续工艺确认批几何均值为 1.04,GCV 为 4.4%。一方面表明工艺批间一致性好,另一方面表明建立的检测方法适用于 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)体外相对效力测定。

综上所述,本研究以人源单克隆抗体 GH4 为包被抗体,CB6-HRP 为检测抗体,建立 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)体外相对效力检测方法,该方法具有良好的专属性、精密度及耐用性,可用于 SARS-CoV-2 重组蛋白疫苗(CHO 细胞)关键质量属性评价。该方法也存在固有缺点,例如存在试验耗时长,配制试剂多,操作烦琐等问题,后期将考虑利用人源单克隆抗体 GH4 及 CH6 开发 ELISA 商业化试剂盒,可缩短检测时间,减少操作步骤,降低检测方法误差。目前,SARS-CoV-2 已出现多种变异株,继续研制特异性针对变异株的疫苗,开发多价、广谱的“全能苗”成为新的趋势和亟待解决的难题。本研究建立的方法,为体外相对效力检测试剂盒的开发奠定了基础,也为针对变异株的疫苗研制和生产中的质量控制提供了技术支撑。

参考文献

- [1] WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [EB/OL]. (2020-2-11)[2020-2-11]. <http://covid19.who.int/>
- [2] 孙校金,王富珍,安志杰,等. 新型冠状病毒疫苗研发进展和思考[J]. 中国疫苗和免疫, 2020, 26(3): 344
SUN XJ, WANG FZ, AN ZJ, et al. Research progress and thinking

- of novel coronavirus vaccine [J]. *Chin J Vaccine Immun*, 2020, 26 (3): 344
- [3] IZDA V, JEFFRIES MA, SAWALHA AH. COVID-19: a review of therapeutic strategies and vaccine candidates [J]. *Clin Immunol*, 2021, 222: 108634. DOI: 10.1016/j.clim.2020.108634
- [4] WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [EB/OL]. (2023-12-31)[2023-12-31]. <http://covid19.who.int/>
- [5] 高帆, 李长贵, 梁争论, 等. 我国新型冠状病毒疫苗研发进展及思考 [J]. *中国药事*. 2020. 34 (4): 375
GAO F, LI CG, LIANG ZL, *et al.* Research progress and consideration in the novel coronavirus vaccine in China [J]. *Chin Pharm Aff*, 2020, 34 (4): 375
- [6] 刘昌孝, 伊秀林, 王玉丽, 等. 认识新冠病毒 (SARS-CoV-2), 探讨抗病毒药物研发策略 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43 (3): 361
LIU CX, YI XL, WANG YL, *et al.* Understanding coronavirus (SARS-COV-2) and thinking about strategy of antiviral drug development [J]. *Drug Eval Res*, 2020, 43 (3): 361
- [7] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE 2 and TMPRSS 2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 81 (2): 271
- [8] MIN L, SUN Q. Antibodies and vaccines target RBD of SARS-CoV-2 [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 671633. DOI: 10.3389/fmolb.2021.671633
- [9] SHI J, ZHENG J, TAI W, *et al.* A glycosylated RBD protein induces enhanced neutralizing antibodies against omicron and other variants with improved protection against SARS-CoV-2 infection [J]. *J Virol*, 2022, 96 (17): e0011822
- [10] CAO Y, ZHU X, HOSSEN MN, *et al.* Augmentation of vaccine-induced humoral and cellular immunity by a physical radiofrequency adjuvant [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 3695
- [11] KAUR SP, GUPTA V. COVID-19 Vaccine: a comprehensive status report [J]. *Virus Res*, 2020, 288: 198114. DIO: 10.1016/j.virus.2020.198114
- [12] WANG J, PENG. Y, XU H, *et al.* The COVID-19 vaccine race challenges and opportunities in vaccine formulation [J]. *AAPS PhamSciTech*, 2020, 21 (6): 225
- [13] 张旋旋, 吴星, 毛群颖, 等. 《欧洲药典》通则“用于疫苗质量控制的体外方法替代体内方法”的解读和思考 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36 (1): 1
ZHANG XX, WU X, MAO QY, *et al.* Interpretation and consideration of “Substitution of *in vivo* method (s) by *in vitro* method (s) for the quality control of vaccines” in General Texts of European Pharmacopoeia [J]. *Chin J Biol*, 2023, 36 (1): 1
- [14] 吴星, 王晓娟, 梁争论. 我国预防性疫苗效价检测方法的现状和思考 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32 (10): 1158
WU X, WANG XJ, LIANG ZL. The current situation and thoughts on the efficacy testing methods of preventive vaccines in China [J]. *Chin J Biol*, 2019, 32 (10): 1158
- [15] 中华人民共和国药典 2020 年版·三部 [S]. 2020: 577
ChP 2020·Vol III [S]. 2020: 577
- [16] 王文辉, 宫立孟, 林凤杰, 等. 新型冠状病毒核蛋白抗原含量 ELISA 检测方法的建立及验证 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35 (8): 968
WANG WH, GONG LM, LIN FJ, *et al.* Development and verification of an ELISA method for determination of nucleocapsid protein content of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 [J]. *Chin J Biol*, 2022, 35 (8): 968
- [17] 李妮, 钊鸿云, 吴晓燕, 等. 新型冠状病毒 S 蛋白抗体制备及双抗体夹心 ELISA 抗原检测方法的建立 [J]. *病毒学报*, 2022, 38 (1): 14
LI N, CHUAN HY, WU XY, *et al.* Preparation of antibody against S protein of COVID-19 and establishment of double antibody sandwich ELISA for antigen detection [J]. *Chin J Virol*, 2022, 38 (1): 14
- [18] WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [EB/OL]. (2024-12-24)[2024-12-24] <http://covid19.who.int/>
- [19] 张卉, 王文辉, 卢佳, 等. 新型冠状病毒感染者 6 个月后抗体滴度分析 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35 (03): 299
ZHANG H, WANG WH, LU J, *et al.* Analysis of antibody titers in patients with COVID-19 6 months after infection [J]. *Chin J Biol*, 2022, 35 (3): 299
- [20] BHAT EA, KHAN J, SAJJAD N, *et al.* SARS-CoV-2: Insight in genome structure, pathogenesis and viral receptor binding analysis—An updated review [J]. *Int immunopharmacol*, 2021, 95: 107493
- [21] 王文辉, 李伟, 王凯文, 等. SARS-CoV-2 灭活疫苗 (Vero 细胞) 体外相对效力双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立及验证 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2024, 37 (4): 487
ANG WH, LI W, WANG KW, *et al.* Development and verification of a double antibody sandwich ELISA method for determination of relative potency *in vitro* of inactivated SARS-CoV-2 vaccine (Vero cells) [J]. *Chin J Biol*, 2024, 37 (4): 487
- [22] 桓瑜, 毕玉海. 2019 新型冠状病毒疫苗研究进展及展望 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2022, 52 (2): 237
HENG Y, BI YH. Research progress and prospect of COVID-19 [J]. *Scientia Sin (Vitae)*, 2022, 52 (2): 237
- [23] U. S. Food and Drug Administration. (2021, May 26). FDA authorizes monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. News release of the Food and Drug Administration [Press release]. FDA. (<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-monoclonal-antibodies-treatment-covid-19-0>)
- [24] DOUGAN M, NIRULA A, AZIZAD M, *et al.* Bamlanivimab plus etesevimab in mild or moderate covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2021, 385 (15): 1382
- [25] SHI R, SHAN C, DUAN X, *et al.* A human neutralizing antibody targets the receptor binding site of SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 584 (7819): 120
- [26] XU K, GAO P, LIU S, *et al.* Protective prototype-beta and delta-omicron chimeric RBD-Dimer vaccines against SARS-CoV-2 [J]. *Cell*, 2022, 185 (13): 2265

(本文于 2024 年 11 月 14 日收到)