

## 猴血浆中抗腺相关病毒 8 中和抗体滴度检测方法的建立及初步确认

陶泽萍<sup>1,2,3</sup>, 曹艳容<sup>4</sup>, 许波华<sup>3</sup>, 周璐<sup>2</sup>, 赵小平<sup>1,4</sup>

(1 上海工程技术大学化学化工学院, 上海 201620; 2 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203; 3 益诺思生物技术南通有限公司, 海门 226133; 4 上海天泽云泰生物医药有限公司, 上海 201210)

**[摘要]** **目的:** 建立一种基于细胞平台的高灵敏度、高效、稳定的猴血浆中抗腺相关病毒 8 (AAV8) 中和抗体滴度的检测方法, 并对该方法进行相关性能的初步确认。**方法:** 在体外将等体积稀释后的猴血浆与 AAV8-Luciferase 孵育后, 取混合液加入铺有 HEK293 细胞的 96 孔板中, 孵育过夜以感染 HEK293 细胞; 细胞裂解后加入萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂, 使用酶标仪检测荧光信号 (RLU), 以评估血浆中抗 AAV8 中和抗体含量, 继而得到相应的抗体滴度。该研究对检测方法的检测灵敏度 (LOD) 及滴度实验重复性、精密度、方法稳健性和样品稳定性等性能进行初步确认。**结果:** 建立了高灵敏度、高效、稳定的细胞水平检测猴血浆中抗 AAV8 中和抗体滴度的方法并完成初步确认。该方法 LOD 值为  $10.36 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 滴度实验重复性、精密度及方法稳健性良好, 阳性对照样品室温放置 24 h、 $2 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 24 h、经  $-65 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim -90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ /室温冻融 6 次均保持稳定。**结论:** 经初步确认, 该方法可以用于猴血浆中抗 AAV8 中和抗体滴度的分析检测, 利于掌握药物治疗进程, 及时调整治疗方案, 对 AAV8 血清型基因治疗药物的研发及个体化治疗有一定提示作用。

**[关键词]** VGB-R04; 中和抗体; 细胞水平; 方法学; 验证**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)16-1622-07

## Establishment and preliminary validation of a method for detecting the titer of anti-adenovirus-associated virus 8 neutralizing antibody in monkey plasma

TAO Ze-ping<sup>1,2,3</sup>, CAO Yan-rong<sup>4</sup>, XU Bo-hua<sup>3</sup>, ZHOU Lu<sup>2</sup>, ZHAO Xiao-ping<sup>1,4</sup>

(1 College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China; 2 Shanghai Innostar Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 3 Nantong InnoStar Biotech Co., Ltd., Haimen 226133, China; 4 Shanghai Vitalgen BioPharma Co., Ltd., Shanghai 201210, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a highly sensitive, efficient, and stable cell-based platform for detection of anti-adenovirus-associated virus 8 (AAV8) neutralizing antibody titer in monkey plasma and perform preliminary validation of the relevant performance of the method. **Methods:** *In vitro*, an equal volume of diluted monkey plasma was incubated with AAV8-Luciferase and then the mixture was added to a 96-well plate lined with HEK293 cells and incubated overnight to infect HEK293 cells; after cell lysis, the cells were added to a firefly luciferase reporter gene assay and the fluorescence signal (RLU) was detected using ELISA to assess the plasma levels of anti-AAV8 neutralising antibodies and subsequently obtain the corresponding antibody titres. The assay's sensitivity (LOD) and titer reproducibility, precision, method robustness and sample stability were preliminary validated. **Results:** A highly sensitive, efficient and stable method for the detection of anti-AAV8 neutralizing antibody titer in monkey plasma at the cellular level was developed and preliminarily validated. The LOD value of the method was  $10.36 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The repeatability, precision and method robustness of the titer assay were good,

**[基金项目]** 上海市科委工程技术研究中心专项基金资助项目 (17DZ2252900)**[作者简介]** 陶泽萍, 女, 硕士研究生, 主要从事药理学及药动学研究。E-mail: 1490422375@qq.com。**[通讯作者]** 赵小平, 女, 博士, 研究员, 主要从事药理学及药动学研究。E-mail: xp.zhao@vitalgen.com。

and the positive control samples were stable after being placed at room temperature and 2 °C ~ 8 °C for 24 h and after freeze-thawing for 6 times at -65 °C ~ -90 °C/room temperature. **Conclusion:** It has been preliminarily validated that the method can be used for the analysis and detection of anti-AAV8 neutralizing antibody titer in monkey plasma, which is useful for grasping the process of drug treatment and adjusting the treatment protocol in time and is suggestive for the development of AAV8 serotype gene therapy drugs and individualized treatment.

**[Key words]** VGB-R04; neutralizing antibody; cellular level; methodology; validation

血友病 B (hemophilia B, HB) 是由凝血因子 IX (FIX) 缺乏和/或其功能障碍所引起的 X 染色体连锁隐性遗传性凝血障碍<sup>[1]</sup>。HB 是目前最适合基因治疗的病种之一,基因治疗有望从根本上治愈 HB,使患者在得到预防性疗效的同时不用长期频繁接受 FIX 注射<sup>[1]</sup>。VGB-R04 为上海天泽云泰生物医药有限公司自主研发且拟用于临床治疗 HB 的基因治疗产品,由重组腺相关病毒 8 (rAAV8) 衣壳蛋白载体以及含有肝脏特异性调控元件和 FIX 高活性变体 (hFIX Padua) 的 DNA 序列表达盒构成。VGB-R04 可在肝脏细胞特异性表达并分泌 hFIX Padua,纠正患者血浆 FIX 的活性缺失以达到治疗目的。

基于腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体的基因疗法是目前唯一在美国和欧洲获批的体内基因疗法<sup>[2]</sup>。重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 载体源于非致病的野生型 AAV,由于其安全性好、宿主细胞范围广 (分裂和非分裂细胞)、免疫原性低、在体内表达外源基因时间长等特点,被视为最有前途的基因转移载体之一,在世界范围内的基因治疗中得到广泛应用<sup>[3]</sup>。人类及非人类灵长类动物 (non-human primates, NHP) 均是 AAV 的天然宿主,体内通常具有针对不同 AAV 血清型的中和抗体<sup>[4-6]</sup>,在 AAV 载体给药后亦会产生高滴度的中和抗体<sup>[7]</sup>,这不利于 AAV 载体药物的治疗;且在某些情况下,AAV 中和抗体在低滴度的情况下也会阻断 AAV 载体的转导<sup>[8-9]</sup>,因此需要在 AAV 载体给药前对动物及患者进行预筛选,且给药后也需要对其体内产生的中和抗体水平进行测定。

基于上述需求,本实验基于体外细胞平台,建立了一种高灵敏度且稳定的猴血浆中抗 AAV8 中和抗体滴度的检测方法,并对该方法进行了初步确认。结果表明,该方法可以用于猴血浆中抗 AAV8 中和抗体的检测和研究,可对 AAV8 血清型基因治疗药物的研发及个体化治疗有一定提示作用。

## 材料与方法

### 1 试剂

AAV8-CMV-Luciferase 腺相关病毒 (维真生物科技有限公司,批号:20210401005/20210609009); Anti-AAV8 (intact particle) mouse monoclonal, ADK8 (德国 Progen 公司,批号:FAK20297-02); ONE-Glo™ Luciferase Assay System (美国 Promega 公司,批号:0000445880); 萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒 [Luciferase Reporter Gene Assay Kit, 翊圣生物科技 (上海) 股份有限公司,批号:L9014130/L5121980], 该试剂盒包含细胞裂解液和萤火虫荧光素酶检测试剂; DMEM basic (1 ×) 培养基 (美国 Gibco 公司,批号:8120136); 胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司,货号:10091148); 牛血清白蛋白 (BSA, 德国 Biofroxx 公司,货号:4240GR500); 青链霉素混合液 (PS, 100 ×, 北京索莱宝科技有限公司,货号:P1400); Tryple™ Express Enzyme (1 ×, 美国 Gibco 公司,货号:12604-013); 1 × PBS 缓冲液 (PBS, 北京索莱宝科技有限公司,货号:P1020); 96 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司,货号:3599); 96F NONTREATED WHITE MICROWELL SH (美国 Thermo 公司,货号:236108)。

### 2 仪器

i3X 酶标仪 (Molecular Devices 公司); Countstar Rigrl S2 全自动荧光细胞分析仪 (上海睿钰生物科技有限公司); HH-2 数显电子恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司)。

### 3 细胞

HEK293 细胞 (上海天泽云泰生物医药有限公司)。

### 4 猴血浆

空白食蟹猴血浆 (江苏鼎泰药物研究股份有限公司)。

### 5 实验方法

**5.1 试剂配制** 完全培养基 (DMEM + 10% FBS + 1% PS) 配制:取 40 mL 的 DMEM,加入 4 mL 的 FBS,

再加入 400  $\mu\text{L}$  的 PS,充分混匀即可,2  $^{\circ}\text{C}$  ~ 8  $^{\circ}\text{C}$  保存。失活 FBS 配置:将 FBS 取出后 4  $^{\circ}\text{C}$  融化,56  $^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min 即可,失活后可根据每次实验需求进行分装, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。1% BSA 配制:称取 BSA 0.5 g,加入 1  $\times$  PBS 50 mL,待充分溶解混合后用 0.22  $\mu\text{m}$  滤头进行过滤除菌,2  $^{\circ}\text{C}$  ~ 8  $^{\circ}\text{C}$  保存。AAV8-Luciferase Stock 配制:取 AAV8-CMV-Luciferase,用 1  $\times$  PBS 稀释 100 倍,用移液器混合均匀(切勿涡旋混匀)后根据每批次实验所需量进行分装,命名为 AAV8-luciferase-stock,保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$ 。AAV8-Luciferase Work Solution 配制:采用 DMEM basic(1  $\times$ )将 AAV8-luciferase Stock 稀释至  $0.37 \times 10^{11}$   $\text{vg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,混合均匀后(切勿涡旋混匀)备用,现配现用。阳性对照抗体复溶液配制:取 Anti-AAV8(intact particle) mouse monoclonal,ADK8 50  $\mu\text{g}$ ,加入 1 mL 灭菌注射用水进行溶解,混匀后进行分装,保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$ ,使用当天采用空白基质(失活 FBS)稀释至所需浓度。

**5.2 样品配制** 猴血浆置于 56  $^{\circ}\text{C}$  水浴中 30 min 失活,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 后,取上清,随后采用失活 FBS 进行梯度稀释直至稀释样品的抑制率小于临界点(cut point,CP,最小稀释倍数为 5)。

**5.3 实验操作步骤** 所有样品均平行 3 个复孔进行检测,且实验时长规划为 3 d。①(d 0)细胞回收重悬:取出 HEK293 细胞培养皿,移除培养基,加入 2 mL 的 1  $\times$  PBS 冲洗 2 次,前后摇晃容器后吸出 PBS,加入 2 mL 的 Tryple 溶液,使其完全覆盖细胞层,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 min 后,加入 2 mL 的 PBS 终止反应,吹打细胞层表面数次,使其分散,将培养皿中所有溶液转移至离心管中,2 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 ~ 5 min,弃上清,再取适量完全培养基重悬细胞沉淀并计数,调整细胞密度至  $5 \times 10^5$   $\text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。②铺板:向 96 孔细胞培养板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$  经密度调整后的细胞重悬液,(37  $\pm$  2)  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育过夜。③(d 1)样品稀释板封闭:另取 96 孔细胞培养板(样品稀释用)每孔加入 300  $\mu\text{L}$  的 1% BSA 溶液,(37  $\pm$  2)  $^{\circ}\text{C}$  孵育 3 h  $\pm$  15 min。④洗板:移除 96 孔细胞培养板(样品稀释用)中 1% BSA 溶液,每孔加入 300  $\mu\text{L}$  的 1  $\times$  PBS,振荡 10 s 后吸净板内液体;重复以上操作 1 次后吸去残留液体。⑤样品孵育:取稀释后的血浆样品与 AAV8-Luciferase Work Solution 加入封闭后的 96 孔细胞培养板(样品稀释用)内 1:1 混合;同时加入阴性对照(NC,不含 AAV8 的 DMEM 与失活 FBS)及阳性对照(PC,AAV8 工作液与失活 FBS),置于

(37  $\pm$  2)  $^{\circ}\text{C}$  温箱内孵育 3 h  $\pm$  15 min。⑥加样:向铺入细胞的 96 孔细胞培养板中每孔加入 30  $\mu\text{L}$  孵育后的样品,轻轻晃动 1 min,(37  $\pm$  2)  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。⑦(d 2)洗板:移除 96 孔细胞培养板中培养基,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  的 1  $\times$  PBS,振荡 10 s 后吸净板内液体;重复以上操作 1 次后吸去残留液体。⑧细胞裂解:向 96 孔细胞培养板中每孔加入 50  $\mu\text{L}$  的细胞裂解液,室温振荡 15 min。⑨检测:每孔吸取细胞裂解后的上清液 30  $\mu\text{L}$ ,转移至 96F NONTREATED WHITE MICROWELL SH 中,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的荧光素酶检测试剂后,置于振荡板上避光振荡 1 min。⑩读数:使用酶标仪在 10 min 内测定荧光相对光单位(RLU)值。

## 6 方法初步确认

对建立的检测猴血浆中抗 AAV8 中和抗体的细胞方法分别进行检测灵敏度(LOD)及滴度实验重复性、精密性、方法稳健性和样品稳定性等方面的初步确认。①检测灵敏度及滴度实验重复性:二者结合进行,灵敏度样品同样作为滴度实验重复性样品。使用失活 FBS 配制含 200  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  阳性对照抗体的滴度实验质控样品(TC 即 TC1:1),并使用失活 FBS 依次稀释 5,20,80,320,1 280 倍分别配置 TC1:5,TC1:20,TC1:80,TC1:320,TC1:1 280 样品。在至少 2 个不同日期对多套滴度实验样品(一套包括 TC1:1,TC1:5,TC1:20,TC1:80,TC1:320,TC1:1 280)至少检测 6 次。根据多套滴度实验样品数据来统计计算 LOD 值,根据滴度值的变化反应滴度实验的重复性。②精密性:使用失活 FBS 稀释阳性对照抗体复溶液配置高浓度阳性质控(HPC,36  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中浓度阳性质控(MPC,24  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、低浓度阳性质控(LPC,12  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )3 个浓度水平样品,同时使用失活 FBS 等体积混合 DMEM basic(1  $\times$ )配制阴性对照(NC),使用失活 FBS 等体积混合 AAV8-Luciferase Work Solution 配制阳性对照(PC)。每个分析批包含 6 套 HPC,MPC,LPC,NC 和 PC 样品。分别在 2 个不同日期共进行至少 3 个独立分析批的检测,评价阳性质控样品(HPC,MPC,LPC)抑制率批内精密度和批间精密性(CV),以评估检测方法精密性水平。③方法稳健性:在精密性实验中通过使用表 1 中最短和最长反应时间,进行 2 个独立分析批的检测,考察不同分析批的精密性以评估方法稳健性。④样品稳定性:选用 HPC,LPC 这 2 个浓度的阳性质控样品进行室温放置 24 h,2  $^{\circ}\text{C}$  ~ 8  $^{\circ}\text{C}$  放置 24 h 以

及  $-65\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -90\text{ }^{\circ}\text{C}$  /室温冻融至少 5 次,每个浓度水平稳定性样品平行配置 3 套,至少进行 1 个独立分析批的检测。评价给定条件下稳定性样品与新鲜配制质控样品抑制率变异系数(CV)。

表 1 最短和最长反应时间

考察指标	最短时间	最长时间
细胞代数	22	38
铺板孵育时间/h	23	24
封闭时间/min	170	190
样品孵育时间/min	170	190
细胞孵育时间/h	16	18
细胞裂解时间/min	13	17

## 7 数据统计分析

采用 SoftMax Pro GxP 7.0.3 软件采集酶标板读数,并用 Microsoft Excel 2010 软件进行一般计算。平均值(Mean)、标准偏差(SD/Std. Dev)、CV、荧光素酶表达百分比、抑制率、临界点信号值、LOD 的计算公式如下:

$$\text{平均值} = \text{数据总和} / \text{数据个数} \quad \text{公式(1)}$$

$$\text{标准偏差} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}} \quad \text{公式(2)}$$

$$\text{CV}/\% = \text{标准差} / \text{平均值} \times 100 \quad \text{公式(3)}$$

荧光素酶表达百分比 = [(样品信号值 - 阴性对照信号值) / (阳性对照信号值 - 阴性对照信号

值)]  $\times 100$  公式(4)

抑制率/% =  $100 - \text{荧光素酶表达百分比}$

公式(5)

临界点信号值 =  $(1 - \text{CP}) \times (\text{PC}_{\text{平均信号值}} - \text{NC}_{\text{平均信号值}}) + \text{NC}_{\text{平均信号值}}$  公式(6)

$\text{LOD}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} = \text{临界点信号值对应的平均抗体浓度} + t_{0.05,df} \times \text{临界点信号值对应抗体浓度值标准差}$  公式(7)

其中  $N$  = 数据个数,  $X_i$  = 单个值,  $\bar{X}$  = 平均值,  $\text{CP} = 50\%$ ,  $df = 8$ ,  $t_{0.05,8} = 1.859\ 55$ ; 采用 Microsoft Excel 2010 软件的 forecast 公式计算临界点信号值对应的抗体浓度。

## 结 果

### 1 检测灵敏度及滴度实验重复性

共测试 9 套滴度实验样品,检测结果见表 2 和表 3。每套滴度实验样品中均有至少 1 个样品抑制率  $\geq \text{CP}$ , 1 个样品抑制率  $< \text{CP}$ , 抑制率  $\geq \text{CP}$  样品复孔信号值 CV 不作要求,满足信号值随浓度升高而降低;抑制率  $< \text{CP}$  样品满足复孔信号值的  $\text{CV} \leq 30\%$ ,符合滴度实验接受标准。经计算 LOD 值为  $10.36\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;根据滴度定义:样品抑制率  $\geq \text{CP}$  (50%) 的最大稀释倍数的倒数,其中 8 套滴度为 1:20,1 套滴度为 1:80,检测结果在相邻的 2 个滴度值范围内波动,表明滴度实验重复性良好。

表 2 检测灵敏度和滴度实验重复性(滴度实验样品)结果

实验批次	套数	数据类型	TC 1: 1	TC 1: 5	TC 1: 20	TC 1: 80	TC 1: 320	TC 1: 1 280	临界点信号值	临界点信号值对应抗体浓度/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
			200	40	10	2.5	0.63	0.16		
5	第 1 套	平均信号值	3.50	419.50	4 683.50	7 523.00	8 376.50	10 593.00	7 503.63	2.55
		复孔信号值 CV/%	60.61	12.98	2.31	3.31	2.05	2.23		
		抑制率/%	100.32	97.53	68.92	49.87	44.14	29.27		
第 2 套	平均信号值	平均信号值	36.50	950.00	4 916.50	7 316.00	7 793.00	8 787.50	1.76	
		复孔信号值 CV/%	36.81	10.72	7.84	5.20	1.52	17.41		
		抑制率/%	100.10	93.97	67.36	51.26	48.06	41.39		
第 3 套	平均信号值	平均信号值	31.00	1 044.50	4 501.50	7 637.00	8 091.00	8 234.50	2.82	
		复孔信号值 CV/%	9.12	16.04	2.40	16.48	4.28	3.74		
		抑制率/%	100.14	93.34	70.14	49.11	46.06	45.10		
6	第 1 套	平均信号值	4.50	153.00	3 506.50	6 629.00	8 600.00	9 806.00	6 388.00	3.08
		复孔信号值 CV/%	78.57	38.82	6.96	1.02	3.42	7.12		
		抑制率/%	100.35	99.18	72.73	48.10	32.55	23.04		
第 2 套	平均信号值	平均信号值	28.00	173.00	3 364.00	6 794.50	7 945.00	9 871.00	3.39	
		复孔信号值 CV/%	70.71	4.90	8.62	4.28	9.35	5.59		
		抑制率/%	100.16	99.02	73.85	46.79	37.72	22.53		

实验批次	套数	数据类型	TC 1: 1	TC 1: 5	TC 1: 20	TC 1: 80	TC 1: 320	TC 1: 1 280	临界点	临界点信号值对应	
			200	40	10	2.5	0.63	0.16	信号值	抗体浓度/ng·mL <sup>-1</sup>	
7	第 3 套	平均信号值	42.00	177.00	3 284.00	7 107.00	8 282.00	8 100.00			3.91
		复孔信号值 CV/%	6.73	40.75	6.29	4.44	5.53	8.33			
		抑制率/%	100.05	98.99	74.48	44.33	35.06	36.50			
	第 1 套	平均信号值	6.50	583.00	6 171.50	10 605.50	11 425.00	14 235.50	7 006.88		8.59
		复孔信号值 CV/%	54.39	4.85	21.94	6.01	16.43	13.49			
		抑制率/%	100.42	96.27	56.02	24.08	18.18	-2.07			
	第 2 套	平均信号值	64.50	990.00	6 016.00	12 061.50	12 492.00	13 007.50			8.77
		复孔信号值 CV/%	20.83	18.43	9.10	5.07	3.96	9.06			
		抑制率/%	100.01	93.34	57.14	13.59	10.49	6.78			
第 3 套	平均信号值	50.00	500.00	6 122.00	11 754.00	12 835.50	13 549.00			8.82	
	复孔信号值 CV/%	19.80	24.61	20.56	14.25	4.90	6.25				
	抑制率/%	100.11	96.87	56.37	15.81	8.02	2.88				
LOD/ng·mL <sup>-1</sup>						10.36					

表 3 检测灵敏度和滴度实验重复性  
(对照样品)结果

实验批次	数据类型	NC	PC
5	平均信号值	51.75	14 955.50
6		48.75	12 727.25
7		65.25	13 948.50

## 2 精密度

在 2 个不同日期对 HPC, MPC, LPC, NC 和 PC 样品共进行 3 个独立分析批的检测,评价检测方法的精密度,结果见表 4。由实验结果可知:对于旧/新批次关键试剂(AAV8-CMV-Luciferase 腺相关病毒,批号:20210401005/20210609009),不同批次阳性质控样品的抑制率批内及批间 CV 均在 30% 以内,均符合精密度 $\leq 30\%$ 的接受标准,因此认为该方法精密度良好。

表 4 精密度结果 %

精密度样品	旧批次关键试剂		新批次关键试剂	
	抑制率批内 CV	抑制率批间 CV	抑制率批内 CV	抑制率批间 CV
HPC	1.56~2.08	2.00	0.72~1.79	2.76
MPC	2.41~4.59	4.14	1.83~4.11	6.11
LPC	3.46~13.31	8.15	3.58~7.60	8.06

## 3 方法稳健性

2 个独立批次的阳性质控样品的抑制率批内 CV 均在 30% 以内,见表 5,符合精密度 $\leq 30\%$ 的接受标准,表明主要实验步骤(孵育时间的变化)对本实验无显著影响,该方法稳健性良好。

表 5 方法稳健性结果 %

稳健性样品	抑制率批内 CV	
	第 12 批(最短时间)	第 9 批(最长时间)
HPC	1.48	1.79
MPC	4.11	3.15
LPC	6.69	7.60

## 4 样品稳定性

在不同条件下放置特定时间后的稳定性样品和新鲜配制的质控样品同时进行检测,结果见表 6 和表 7。所有稳定性样品的抑制率 $\geq 50\%$ ,均呈阳性,见表 6,且所有样品抑制率 CV 均在 30% 以内,见表 7,表明该批次样品符合稳定性接受标准。该检测方法下,阳性对照样品在室温放置 24 h、2℃~8℃放置 24 h、经-65℃~-90℃/室温冻融 6 次后均保持稳定。

表 6 稳定性结果 %

数据类型	样品	HPC1	HPC2	HPC3	LPC1	LPC2	LPC3
抑制率	室温稳定性	93.65	94.43	95.55	76.21	72.95	75.04
	2℃~8℃稳定性	94.78	94.37	95.07	72.15	73.27	71.91
	冻融 6 次稳定性	94.36	94.78	94.21	72.92	70.13	71.77

表7 稳定性结果 %

数据类型	验证指标	稳定性样品		新鲜质控样品	
		HPC	LPC	HPC	LPC
抑制率 CV	室温稳定性	0.82	1.80	1.12	2.79
	2℃~8℃稳定性	0.30	0.82		
	冻融6次稳定性	0.26	1.60		

## 讨 论

在目前可用的基因治疗平台中,基于 AAV 的载体显然已成为最有前途的基因传递载体之一。目前,只有 3 种体内基因疗法被监管机构批准用于临床,这 3 种均基于 AAV 载体<sup>[10]</sup>。2012 年,欧洲 EMA 首次批准使用基于 AAV 载体递送缺陷蛋白来治疗脂蛋白脂肪酶缺乏症,但由于缺乏需求,目前已不再上市;用于治疗儿童早期失明症 Leber 2 型先天性黑蒙的 Luxturna 同时在美国和欧洲临床上使用<sup>[10-11]</sup>;Zolgensma 用于治疗脊髓性肌萎缩症 (SMA),已于 2019 年获得美国 FDA 的批准<sup>[10]</sup>。

许多人和动物会自然感染 AAV<sup>[4-5]</sup>,这会触发浆 B 细胞分泌中和抗体,即使在初始感染清除后相当长的一段时间内也会持续存在<sup>[12]</sup>。当再次遇到 AAV 衣壳时,浆 B 细胞会进一步受到刺激产生更多中和抗体<sup>[7]</sup>。AAV 的中和抗体在成年人中的患病率非常高,约为 30%~80%<sup>[4,13-15]</sup>,即使使用相同的检测方法,中和抗体的患病率也会存在显著差异<sup>[11,16]</sup>。这给 AAV 载体在基因治疗领域的应用带来了巨大障碍,因为即使中和抗体滴度较低,也会对 AAV 载体的转导产生不利影响<sup>[8-9]</sup>。因此,临床(前)治疗需要对患者(动物)进行广泛的预筛选,以确定和监测其中和抗体水平。

目前,AAV 基因治疗正在迅速扩大,已有 100 多项正在进行或完成的临床试验(www.clinicaltrials.gov)。随着 AAV 载体及重组 AAV 载体的成功使用和数量的增加,也增加了对已存在的抗 AAV 中和抗体检测的需求。但是,检测中和抗体的方法尚未标准化。许多检测通过添加腺病毒、化学药物或使用基因操作细胞增强 AAV 转导。此外,检测中所使用的病毒量以及所使用的报告基因并不统一。一般来说,中和滴度被定义为抑制率 $\geq 50\%$ 的最高稀释度,也使用了其他抑制率,如 29%<sup>[17]</sup>;大多数研究使用的中和滴度为 1/20<sup>[4,14]</sup>,但也有研究将血清/血浆阳性定义为中和滴度 $\geq 1/3.1$ <sup>[18-19]</sup>。从临床角度来

看,中和抗体滴度检测非常重要,因为存在针对所使用的 AAV 血清型的中和抗体是临床用药一个关键的排除标准。

中和抗体检测通常分为 2 种:基于细胞的分析检测(CBA)和竞争性配体结合分析检测(CLBA)<sup>[20]</sup>,监管机构推荐基于细胞的分析检测作为首选方法,因为细胞反应更能反映中和抗体在体内对药物的影响。Wu 等<sup>[20]</sup>通过对比 CBA 与 CLBA 这 2 种方法在检测贝那利珠单抗中和抗体时精密度、灵敏度以及药物耐受性等方面的差异,指出 CLBA 比 CBA 精密度更高,药物耐受性同样相对较高,对单克隆 ADA 阳性对照及多克隆 ADA 阳性对照的检测灵敏度也相对较高。Hu 等<sup>[21]</sup>在 3 项临床研究中也进行了 CBA 和 CLBA 法的对比,其中 2 项研究结果表明 CBA 和 CLBA 检测中和抗体的能力相当,在第 3 项研究中,CBA 表现相对更好。因此无论是 CBA 还是 CLBA,都存在自身的优势和局限性,应根据每种药物的作用机制、免疫风险评估以及技术可行性评估去选择和设计中中和抗体检测方法<sup>[22]</sup>。

本研究中的中和抗体检测基于 CBA,使用 HEK293 细胞感染携带荧光素酶基因的 AAV8-CMV-Luciferase 腺相关病毒后表达荧光素酶,荧光素酶催化底物荧光素生成可发光的产物,产物越多荧光值越高;若存在抗 AAV8 中和抗体,携带荧光素酶基因的 AAV8 即无法感染 HEK293 细胞并表达荧光素酶,荧光值因而减低,通过检测荧光值评估在血浆中抗 AAV8 中和抗体的含量。选用具有中和活性的 Anti-AAV8(intact particle) mouse monoclonal,ADK8 作为阳性对照抗体,并成功验证该阳性对照抗体的稳定性。

本研究建立了细胞水平检测猴血浆中 AAV8 中和抗体滴度的方法,并对该方法的检测灵敏度及滴度实验重复性、精密度、方法稳健性和样品稳定性等方面进行了初步确认,确定该分析方法的适用性。该检测方法,阳性对照样品室温放置 24 h、2℃~8℃放置 24 h、经-65℃~-90℃/室温冻融 6 次均保持稳定。因此,本研究已建立基于细胞平台猴血浆中 AAV8 中和抗体滴度的检测方法,可拟用于后续给药 VGB-R04 的猴血浆中 AAV8 中和抗体滴度的检测,利于掌握 VGB-R04 药物治疗进程,及时调整治疗方案,并对 AAV8 血清型基因治疗药物的研发及个体化治疗有一定提示作用。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] 彭建强. rAAV 载体介导人凝血因子 IX 基因治疗血友病 B 的研究[D]. 湖南: 中南大学, 2004.
- [2] WEBER T. Anti-AAV antibodies in AAV gene therapy: current challenges and possible solutions[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 658399.
- [3] 郑少江, 卢彦达, 陈云, 等. 重组腺相关病毒载体, 重组腺相关病毒 AAV8-PD1 及其应用: CN110982841A[P]. 2020 - 04 - 10.
- [4] CALCEDO R, VANDENBERGHE LH, GAO GP, *et al.* World-wide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses[J]. *J Infect Dis*, 2009, 199(3): 381 - 390.
- [5] LIU Q, HUANG W, ZHANG H, *et al.* Neutralizing antibodies against AAV2, AAV5 and AAV8 in healthy and HIV-1-infected subjects in China: implications for gene therapy using AAV vectors[J]. *Gene Ther*, 2014, 21(8): 732 - 738.
- [6] WANG LL, CALCEDO R, WANG H, *et al.* The pleiotropic effects of natural AAV infections on liver-directed gene transfer in macaques[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(1): 126 - 134.
- [7] MANNO CS, PIERCE GF, ARRUDA VR, *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response[J]. *Nat Med*, 2006, 12(3): 342 - 347.
- [8] HURLBUT GD, ZIEGLER RJ, NIETUPSKI JB, *et al.* Preexisting immunity and low expression in Primates highlight translational challenges for liver-directed AAV8-mediated gene therapy[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(11): 1983 - 1994.
- [9] SCALLAN CD, JIANG HY, LIU TY, *et al.* Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice[J]. *Blood*, 2006, 107(5): 1810 - 1817.
- [10] HOY SM. Onasemnogene abeparvovec: first global approval[J]. *Drugs*, 2019, 79(11): 1255 - 1262.
- [11] KUMARAN N, MICHAELIDES M, SMITH AJ, *et al.* Retinal gene therapy[J]. *Br Med Bull*, 2018, 126(1): 13 - 25.
- [12] CALCEDO R, MORIZONO H, WANG LL, *et al.* Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(9): 1586 - 1588.
- [13] KRUIK A, FETAHAGIC D, HARTLIEB B, *et al.* Prevalence of anti-adeno-associated virus immune responses in international cohorts of healthy donors[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 14: 126 - 133.
- [14] BOUTIN S, MONTEILHET V, VERON P, *et al.* Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(6): 704 - 712.
- [15] LOUIS JEUNE V, JOERGENSEN JA, HAJJAR RJ, *et al.* Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy[J]. *Hum Gene Ther Methods*, 2013, 24(2): 59 - 67.
- [16] GREENBERG B, BUTLER J, FELKER GM, *et al.* Prevalence of AAV1 neutralizing antibodies and consequences for a clinical trial of gene transfer for advanced heart failure[J]. *Gene Ther*, 2016, 23(3): 313 - 319.
- [17] MAJOWICZ A, NIJMEIJER B, LAMPEN MH, *et al.* Therapeutic hFIX activity achieved after single AAV5-hFIX treatment in hemophilia B patients and NHPs with pre-existing anti-AAV5 NABs[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 14: 27 - 36.
- [18] MURPHY SL, LI H, MINGOZZI F, *et al.* Diverse IgG subclass responses to adeno-associated virus infection and vector administration[J]. *J Med Virol*, 2009, 81(1): 65 - 74.
- [19] MINGOZZI F, CHEN Y, EDMONSON SC, *et al.* Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue[J]. *Gene Ther*, 2013, 20(4): 417 - 424.
- [20] WU YL, AKHGAR A, LI JJ, *et al.* Selection of a ligand-binding neutralizing antibody assay for benralizumab: comparison with an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) cell-based assay[J]. *Aaps J*, 2018, 20(3): 49.
- [21] HU J, WALA I, HAN H, *et al.* Comparison of cell-based and non-cell-based assay platforms for the detection of clinically relevant anti-drug neutralizing antibodies for immunogenicity assessment of therapeutic proteins[J]. *J Immunol Methods*, 2015, 419: 1 - 8.
- [22] 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.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-03-09