

新型冠状病毒中和抗体生物学活性的测定

俞小娟¹, 王安², 陈奔², 蒋雯², 李纲², 王荣娟², 张皎², 王文波¹, 段茂芹¹, 于传飞^{1*}, 王兰^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会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; 2. 迈威(上海)生物科技股份有限公司, 上海 201210)

摘要: **目的** 开发针对新型冠状病毒中和抗体生物学活性及免疫学特性分析的方法。 **方法** 使用生物膜层干涉法 (biolayer interferometry, BLI) 分析 9MW3311 中和抗体 Fab 和 S1-RBD 的亲和力常数; 分别使用酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 和流式细胞分选法评价中和抗体结合片段 (antibody binding fragment, Fab 端) 和 S 蛋白的相对结合活性和对 ACE2 的阻断结合活性; 使用假病毒体系评价中和抗体的体外细胞学活性; 使用表面等离子共振法 (surface plasmon resonance, SPR) 测定抗体 Fc 段与 Fc γ 和 FcRn 受体的亲和力常数; 使用 ELISA 法测定抗体 Fc 段和 C1q 受体的结合活性; 采用 PBMC 法确定中和抗体的体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、补体 (First subcomponent of the C1 complex) 介导的细胞毒性作用 (complement dependent cytotoxicity, CDC); 使用假病毒系统评价中和抗体的依赖性感染增强作用 (antibody-dependent enhancement, ADE) 效应。 **结果** 3 批 9MW3311 中和抗体和参比品与 S1-RBD 的亲和力常数 $KD(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 值分别为 1.15×10^{-9} , 1.01×10^{-9} , 1.15×10^{-9} 和 9.45×10^{-10} ; ELISA 和 FACS 分别测得 3 批中和抗体相对参比品的结合活性为 101%、96%、100% 及 98%、113%、108%; ELISA 和 FACS 分别测得 3 批中和抗体相对参比品对 ACE2 的阻断活性为 100%、95%、91% 及 94%、101%、94%; 3 批中和抗体相对参比品对假病毒的中和活性分别 91%、93%、108%; 3 批 9MW3311 中和抗体和参比品分别与 Fc γ R 和 FcRn 均有同等水平的亲和力; 9MW3311 无 ADCC 和 CDC 活性; LALA 突变的中和抗体可有效避免 ADE 效应。 **结论** 初步建立了新型冠状病毒中和抗体生物学活性及免疫学特性分析的方法, 可用于该类型制品的常规质量控制和放行。

关键词: 新型冠状病毒; 中和抗体; 生物学活性; 免疫学特性

doi:10.11669/cpj.2024.04.009 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)04-0353-10

Assay of Biological Activity of anti-SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies

YU Xiaojuan¹, WANG An², CHEN Ben², JIANG Wen², LI Gang², WANG Rongjuan², ZHANG Jiao², WANG Wenbo¹, DUAN Maoqin¹, YU Chuanfei^{1*}, WANG Lan^{1*} (1. NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Mabwell (Shanghai) Bioscience Co., Ltd., Shanghai 201210, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop the methods for biological activity assay and immunological characteristics analysis of anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. **METHODS** The binding affinity of 9MW3311 Fab and S1-RBD were analyzed by biolayer interferometry. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and fluorescence activated cell sorter (FACS) were used to evaluate the relative binding activity to S protein and blocking activity to angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) of 9MW3311 antigenbinding fragments (Fab). *In vitro* cytological activity of neutralizing antibody was evaluated by pseudovirus system. The binding affinities of neutralizing antibody Fc with Fc receptor (Fc γ) and Fc receptor neonatal (FcRn) receptor were determined by surface plasmon resonance (SPR). The binding activity of Fc and complement component 1 (C1q) receptor was determined by ELISA. The antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement dependent cytotoxicity (CDC) of neutralizing antibodies were determined by peripheral blood mononuclear cell (PBMC) method. The antibody-dependent enhancement (ADE) effect was evaluated using pseudovirus system. **RESULTS** The affinity constants (KD) of 9MW3311 and reference to S1-RBD were 1.15×10^{-9} , 1.01×10^{-9} , 1.15×10^{-9} and 9.45×10^{-10} , respectively. ELISA and FACS showed that the binding activities of neutralizing antibodies were 101%, 96%, 100% and 98%, 113%, 108%, respectively. ELISA and FACS showed that the blocking activities of neutralizing antibodies against ACE2 were 100%, 95%, 91% and 94%, 101%, 94%, respectively. The neutralizing activities of the three batches of neutralizing

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (21702007); 国家重点研发计划项目资助 (2021YFF0600804)

作者简介: 俞小娟, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 治疗型生物制品的质量控制; 王安, 女, 硕士研究生 研究方向: 单抗研发及质量控制。俞小娟和王安是共同第一作者 * 通讯作者: 于传飞, 男, 博士, 研究员 研究方向: 治疗型生物制品的质量控制 Tel: (010)53852159; 王兰, 女, 博士, 研究员 研究方向: 治疗型生物制品的质量控制 Tel: (010)53852159

antibodies against pseudovirus were 91% , 93% and 108% , respectively. The three batches of 9MW3311 and reference showed the same affinity constants (KD) with Fc γ and FcRn. 9MW3311 showed no ADCC and CDC activity. L234A/L235A (LALA) mutant of 9MW3311 could effectively avoid ADE effect. **CONCLUSION** The methods for analysis of the biological activity and immunological characteristics of anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies are preliminarily established and can be used for routine quality control and release.

KEY WORDS: COVID-19; neutralizing antibody; biological activity; immunological characteristic

新型冠状病毒感染 (corona virus disease 2019, COVID-19) 是由新型冠状病毒 SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) 引起的全球暴发性传染病^[1], 严重危害人类的生命安全, 对世界上多数国家的经济造成了破坏性影响。虽然全球的疫苗接种剂次已达 77 亿^[2], 但并未能阻止病毒的感染和传播。目前的药物治疗主要是对症治疗, 包括抗病毒治疗、免疫治疗及中药治疗等, 虽然能够改善症状甚至治愈出院, 但并无法彻底清除病毒, 仍未有特效药批准上市, 因此亟需针对该病毒的特效药来阻止这场让全人类陷入困境的恶性病毒^[3]。

SARS-CoV-2 通过表面刺突蛋白 (spike, S) N 端 S1 亚基上的受体结合区域 (receptor binding domain, RBD) 与受体血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme2, ACE2) 结合, 并入侵宿主细胞, 从而感染人体^[4-6], 因此 S 蛋白是诸多小分子药物、中和抗体药物^[7-9] 重要的开发靶点。以 S 蛋白为靶点的新型冠状病毒中和抗体可通过两种机制直接或间接的对抗病毒感染, 直接机制即抗体 Fab 端的功能, 通过 Fab 可变区与 S 蛋白的结合, 竞争性抑制 S 蛋白与受体 ACE2 的结合, 从而阻止病毒对宿主细胞的感染; 间接机制依赖于抗体的 Fc 端, 发挥功能需要中和抗体 Fc 端与人体免疫系统的成分相结合, 如抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、补体 C1q (first subcomponent of the C1 complex) 介导相关的细胞毒性作用 (complement dependent cytotoxicity, CDC) 等^[10]。因此, 中和抗体的活性评价包含与 Fab 段功能相关的结合活性、对受体 ACE2 的阻断活性、细胞学活性以及与 Fc 段功能相关的 ADCC 活性和 CDC 活性等。

中和抗体 Fc 段与新生儿受体 (neonatal Fc receptor, FcRn) 的相互作用与血清中抗体的半衰期密切相关^[11]。此外, 抗体依赖性感染增强作用 (antibody-dependent enhancement, ADE) 最早在登革热和黄热病毒中被发现, 在急性呼吸综合征 (severe acute

respiratory syndromes coronavirus, SARS-CoV) 和中东呼吸综合征 (middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 两种冠状病毒中同样存在, 指抗体与病毒结合后, 增强病毒感染的过程, 因此在新型冠状病毒的疫苗开发和抗体药物的开发时, 同样需要考虑半衰期和 ADE 效应^[12], 研究表明, 在抗体的 Fc 段引入 LALA 突变, 即将 Fc 重链 242 位和 243 位的亮氨酸突变为丙氨酸 (L234A/L235A) 可减弱 ADE 效应 (图 1)^[13-15]。

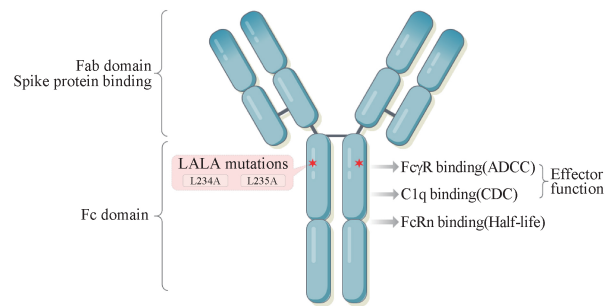


图 1 新型冠状病毒中和抗体模式图

Fig. 1 Figure of anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies

基于此, 为了加快推进新型冠状病毒中和抗体的审评审批和上市, 本研究参照药品审评中心《新型冠状病毒中和抗体类药物申报临床药学研究与技术资料要求指导原则》, 开发了针对新型冠状病毒中和抗体生物学活性的分析方法, 分别对中和抗体的 Fab 段及 Fc 段功能进行了分析, 并对 ADE 效应进行了评价。

1 材料与设备

1.1 主要试剂

新型冠状病毒中和抗体及参比品: 重组全人源抗新型冠状病毒单克隆抗体 (分子代号: 9MW3311) 及参比品由迈威 (上海) 生物科技股份有限公司提供; 带抗体可结晶片段 (fragment crystallizable, Fc) 标签的 ACE2 (human ACE2-hFc), 带多组氨酸标签 (histidine, His) 及抗体可结晶片段 Fc 标签的重组

S1-RBD 蛋白 (S1-RBD-His、S1-RBD-mFc) 由迈威 (上海) 生物科技股份有限公司提供; 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗人抗体 (immunoglobulin, IgG) (美国 Thermo 公司); HRP 标记的鼠抗 His 抗体 (康为世纪生物科技股份有限公司); 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的羊抗鼠抗体 (美国 Sigma 公司); 带红 (橙) 色荧光蛋白标签标记的人 ACE2 蛋白 (Human ACE2-OPF tag) (北京义翘神州科技股份有限公司); 人肝癌细胞 Huh-7 (中国食品药品检定研究院留存); 新型冠状病毒假病毒颗粒 (北京天坛药物); 荧光素酶检测试剂盒 (美国 PerkinElmer 公司); CM5 芯片 (美国 GE Healthcare 公司); Fc γ R 及 FcRn (Sino Biological 公司); C1q 蛋白 (美国 Quidel 公司); HRP 标记的 C1q 抗体 (英国 Abcam 公司); 人 Expi293 细胞; 人乳腺癌细胞 SK-BR-3; 淋巴瘤细胞 Raji (中国上海科学院细胞库); SARS-CoV-2 Spike 基因表达质粒 (北京义翘神州科技股份有限公司); Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (日本 DOJINDO 公司); 正常人血清补体 (美国 Quidel 公司); 刃天青 (Resazurin) 细胞活性检测染料 (苏州瑞安生物科技有限公司)。

1.2 仪器设备

OcterRED96 Fortebio (美国 PALL 公司); SpectraMaxM2 多功能酶标仪及 SOFTMAX 软件 (美国 Molecular Devices 公司); B49009AD CytoFLEX 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); T200 Biacore (美国 GE Healthcare 公司)。

2 方法

2.1 生物膜层干涉法 (biolayer interferometry, BLI)

测定新型冠状病毒中和抗体 9MW3311 Fab 与 S1-RBD 的亲合力: 将抗人 IgG 捕获生物传感器 (Anti-Human Fc Capture, AHS) 浸润于测定缓冲液 (1 \times PBS) 中平衡 10 min, 供试品用 1 \times PBS 稀释至工作浓度 (4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 备用, 重组 S1-RBD-His 蛋白用 1 \times PBS 分别稀释至工作浓度 (90, 30, 15, 7.5 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 备用。设置测定程序, 将 AHC 生物传感器浸入 200 μL 稀释后的抗体样品溶液中进行孵育, 然后将 AHC 生物传感器转移至实验缓冲液 (1 \times PBS) 中平衡 240 s。进一步将 AHC 生物传感器与稀释至工作浓度的 S1-RBD-His 进行结合反应, 结合时间 300 s, 之后将 AHC 生物传感器转移至 1 \times PBS 缓冲液中, 进行解离反应,

时间为 300 s。

2.2 酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

2.2.1 与 S1-RBD 的相对结合活性 将 S1-RBD-His 抗原用碳酸钠缓冲溶液 (pH 9.5) 稀释至 600 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔加入 100 μL 至酶标板中, 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 包被 18 h。室温封闭 120 min 后, 每孔加入 100 μL 系列稀释的样品, 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。洗板后每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗人 Fc 二抗 (1: 10 000 倍稀释), 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 洗板, 加入 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, TMB) 底物, 以 450 nm 为检测波长, 650 nm 为参比波长双波长测定吸光度值。以抗体浓度为 X 轴, 对应的吸光值为 Y 轴, 选用四参数方程对样品的结合活性进行分析。

2.2.2 对 ACE2 的阻断活性 将 Human ACE2-hFc 用碳酸钠缓冲溶液 (pH 9.5) 稀释至 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔加入 100 μL 至酶标板中, 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 包被 18 h。室温封闭 120 min 后, 100 μL 每孔加入系列稀释的样品与 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 S1-RBD-His 等体积混合后的样品 (室温下 600 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 混匀 5 min), 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。洗板后每孔加入 100 μL HRP 标记的鼠抗 His 二抗 (1: 5 000 倍稀释), 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 洗板后加入 TMB 底物, 检测波长、读数方式与数据处理方式同“2.2.1”项, 以分析新型冠状病毒中和抗体 9MW3311 Fab 对 ACE2 的阻断活性。

2.2.3 与 C1q 的结合活性 将抗体用碳酸钠缓冲溶液 (pH 9.5) 进行梯度稀释, 获得 8 个不同浓度的抗体 (45 ~ 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 每孔加入 100 μL 至酶标板中, 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 包被 18 h。室温封闭 120 min 后, 100 μL 每孔加入 C1q 蛋白, 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 120 min。洗板后每孔加入 100 μL HRP 标记的抗 C1q 二抗, 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 洗板后加入 TMB 底物, 检测波长、读数方式与数据处理方式同“2.2.1”项, 以分析样品与 C1q 受体的结合活性。

2.3 流式细胞分选法 (fluorescence activated cell sorting, FACS)

2.3.1 与 S1-RBD 的相对结合活性 将含有全长 SARS-CoV-2 Spike 基因的表达质粒, 通过转染试剂 293fectin 转入 HEK293 细胞中, 培养 24 ~ 48 h。室温封闭 30 min 后, 每管加入 200 μL 系列 1: 3 稀释的样品, 放置于冰上孵育 60 min。清洗细胞后每孔加入 100 μL FITC 标记的羊抗人二抗 (1: 200 倍稀

释)放置于冰上孵育 45 min,清洗细胞,以 200 μL PBS 溶液重悬,用流式细胞仪进行分析。以抗体浓度为 X 轴,对应的相应信号值为 Y 轴,选用四参数方程对样品的相对结合活性进行分析,以抗体浓度的 Log 值为横坐标 X,信号响应应值 RLU 为纵坐标 Y,使用 SOFTMAX 软件进行四参数曲线拟合分析,拟合方程为 $Y = D + (A - D) / \{1 + (X/C)^B\}$,其中 A 是上渐近线处的最小响应,D 是下渐近线处的最大响应、B 是上和下渐近线之间浓度响应曲线的斜率,系数 C 是半最大效应浓度 (concentration for 50% of maximal effect, EC_{50})。

2.3.2 对 ACE2 的阻断活性 将含有全长 human ACE2 基因的表达质粒(带有 OFP tag),通过转染试剂 293fectin,转入 HEK293 细胞中,培养 24 ~ 48 h。室温封闭 30 min 后,每管加入 200 μL 系列 1:3 稀释的样品与 0.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 S1-RBD-mFc 等体积混合孵育后的供试品(室温孵育 60 min),放置于冰上孵育 60 min。清洗细胞后每孔加入 100 μL FITC 标记的羊抗鼠二抗(1:200 倍稀释)放置于冰上孵育 45 min,清洗细胞,以 200 μL PBS 溶液重悬,用流式细胞仪进行分析。数据处理方法同“2.3.1”。

2.4 假病毒中和法

用 DMEM 完全培养基(10% FBS, 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES 缓冲液,1% 青链霉素双抗)将 COVID-19 假病毒颗粒稀释至 $1.0 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ $\text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ (500 ~ 1 000 TCID_{50} 每孔),每孔加入 50 μL 至酶标板中,然后每孔加入 100 μL 系列稀释的样品与假病毒进行中和反应,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱孵育 60 min。设置不加病毒组为阴性对照细胞对照孔(CC)值,不加供试品组为阳性对照病毒对照孔(VC)值。在上述中和后的板内,每孔加入 100 μL 的(密度为 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$) Huh 7 细胞,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中孵育 20 ~ 28 h。取出细胞培养板,每孔弃 150 μL 细胞培养上清,每孔加入 100 μL 的荧光素酶底物,避光反应 2 min,吹打混匀后每孔吸取 150 μL 反应液至白板中,置于酶标仪中采集化学发光信号。采用公式 1 计算中和抑制率。

中和抑制率 (%) = $[1 - (\text{样品孔荧光均值} - \text{CC 荧光均值}) / (\text{VC 荧光均值} - \text{CC 荧光均值})] \times 100\%$ 公式(1)

以供试品工作浓度为 X 轴,中和抑制率为 Y 轴,选用四参数方程对供试品的假病毒中和活性进行分析。

2.5 表面等离子共振法 (surface plasmon resonance, SPR)

测定新型冠状病毒中和抗体与 $\text{Fc}\gamma\text{R}/\text{FcRn}$ 的亲和力:用醋酸钠 (pH 4.5) 将抗 His 抗体稀释至 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 偶联至 CM5 芯片上,用乙醇胺 (1 M, pH 8.5) 注射 420 s 封闭剩余的活化位点。用 HBS-EP + (pH 7.4) 将 $\text{Fc}\gamma\text{RI}/\text{CD64}$ 稀释至 0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,以 10 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速分别将上述受体捕获于 CM5 芯片中,流经不同浓度的抗体,以 30 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速,注入芯片 1、2 通道,设置结合时间 30 s,解离时间 60 s;用 HBS-EP + (pH 7.4) 将 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}/\text{CD32b}$ 及 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}/\text{CD32a}$ 稀释至 0.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,以 10 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速分别将上述受体捕获于 CM5 芯片中,流经不同浓度的抗体,以 30 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速,注入芯片 1、2 通道,设置结合时间 60 s,解离时间 60 s;用 HBS-EP + (pH 6.0) 将 FcRn 稀释至 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,以 10 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速分别将上述受体捕获于 CM5 芯片中,流经不同浓度的抗体,以 30 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速,注入芯片 1、2 通道,设置结合时间 60 s,解离时间 45 s。最后均使用 pH 1.5 的甘氨酸对芯片再生,再生时间 30 s,流速 30 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。仪器设定温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.6 抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC)

将含有全长 SARS-CoV-2 Spike 基因的表达质粒,通过转染试剂 TA-293 Transfection Reagent,转入 Expi293 细胞中,125-130 rpm 振荡培养 40 ~ 48 h,作为靶细胞;以 SK-BR-3 细胞,Herceptin 抗体作为系统阳性对照。将靶细胞稀释至 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,然后在 96 孔细胞培养板中每孔加入 25 μL 细胞,50 μL 梯度稀释的供试品,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,再加入 25 μL 的效应细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PB-MC),密度为 $5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h,取出细胞培养板,每孔加入 100 μL LD 底物,室温反应 30 min,每孔加入 50 μL 的终止液,以 490 nm 为检测波长测定吸光度值。以公式 2 计算细胞裂解率。

细胞裂解率 (%) = $[(\text{OD}_{\text{ER}} - \text{OD}_{(\text{T}+\text{E})\text{SR}}) / (\text{OD}_{\text{TMR}} - \text{OD}_{\text{TSR}})] \times 100\%$ 公式(2)

ER:效应细胞背景对照;(T + E)SR:效应细胞 + 靶细胞背景对照;TMR:靶细胞裂解对照 (100% 裂解);TSR:靶细胞背景对照。

以抗体浓度为 X 轴,对应的细胞裂解率为 Y 轴,选用四参数方程对供试品的 ADCC 效应进行分析。

2.7 补体依赖的细胞毒性作用 (CDC)

每孔加入 50 μL 的 24% 人血清补体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育

2 h。取出细胞培养板,每孔加入 15 μL 的 Resazurin 细胞活性检测染料, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 ~ 20 h, 以 530 nm 为激发波长, 590 nm 为发射波长测定荧光值。以不加抗体及补体组的荧光读值为阴性对照 (E), 以细胞加补体组的荧光读值为自发杀伤对照组 (S), 供试品荧光读值为 M, 以公式 3 计算 CDC。

$$\text{CDC}(\%) = (E - S) / (M - S) \times 100\% \quad \text{公式(3)}$$

以抗体浓度为 X 轴, 对应的 CDC % 为 Y 轴, 选用四参数方程对供试品的 CDC 效应进行分析。

2.8 ADE 效应评价

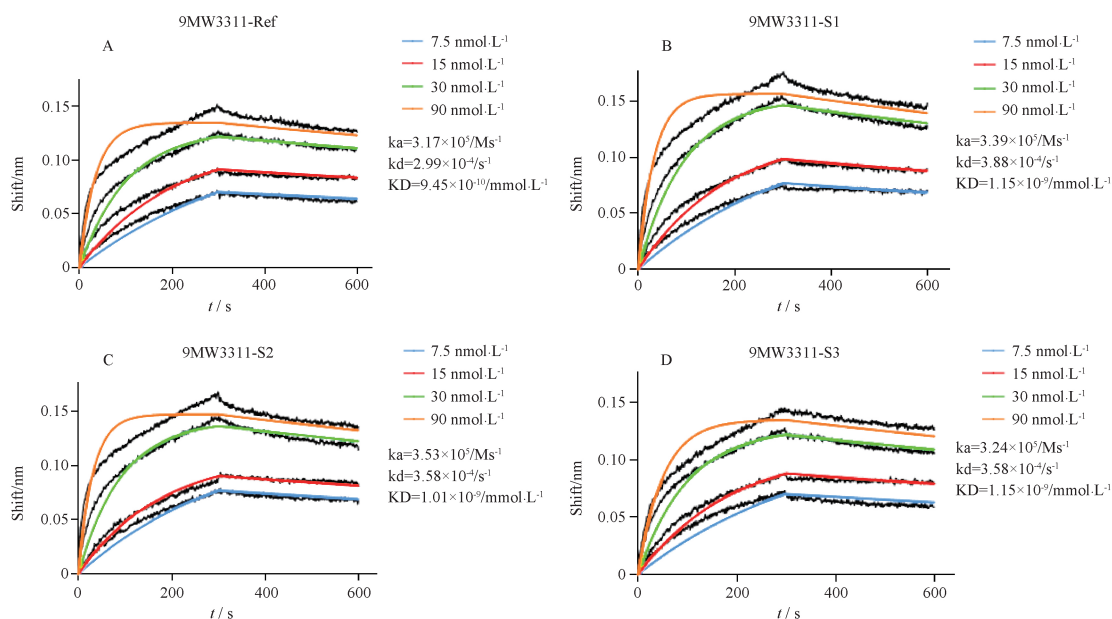
将假病毒颗粒稀释至 $1.0 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ $\text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1}$ (500 ~ 1 000 TCID_{50} 每孔), 加入 25 μL 至细胞培养板中, 然后每孔加入 25 μL 系列稀释的样品与假病毒进行中和反应, 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数 5% CO_2 培养箱孵育 60 min。设置 VC 和 CC, 其中 VC 加入 25 μL 假病毒溶液和 25 μL 完全培养基, CC 加入 50 μL 完全培养基。在上述中和后的板内, 每孔

加入 50 μL 的 Raji 细胞(密度为 2×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 20 ~ 28 h。取出细胞培养板, 每孔加入 100 μL 的荧光素酶底物, 避光反应 2 min, 置于酶标仪中采集化学发光信号。以供试品工作浓度为 X 轴, 化学荧光响应信号为 Y 轴, 对供试品的 ADE 效应进行分析。

3 结果

3.1 9MW3311 Fab 与 S1-RBD 的结合动力学及亲和常数

使用 BLI 法测定 9MW3311 及其参比品与 S1-RBD 的亲和力, 使用 1:1 的动力学模型, 对曲线进行拟合分析, 结果表明(图 2), 9MW3311 中和抗体与 S1-RBD 的结合属于快结合慢解离的方式, 亲和能力较强, KD 值均在 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平, 且 3 批 9MW3311 和参比品与 S1-RBD 抗原的亲和力水平基本保持一致。



A - 9MW3311-Ref; B - 9MW3311-S1; C - 9MW3311-S2; D - 9MW3311-S3; K_a - 结合速率常数; K_d - 解离速率常数; K_D - 平衡解离常数。

A - 9MW3311-Ref; B - 9MW3311-S1; C - 9MW3311-S2; D - 9MW3311-S3; K_a - association rate constant; K_d - dissociation rate constant; K_D - dissociation equilibrium constant.

图 2 3 批 9MW3311 及参比品与新型冠状病毒 S 糖蛋白-S1 受体结合区域 (S1-RBD) 的亲和动力学拟合曲线 [生物薄膜干涉技术 (BLI) 法]

Fig. 2 Affinity analysis of three batches of 9MW3311 and reference to S1-RBD (BLI)

3.2 9MW3311 与 S1-RBD 及 S 蛋白的相对结合活性

3.2.1 ELISA 法 使用 ELISA 法测定 9MW3311 及其参比品与 S1-RBD 在蛋白水平的相对结合活性, 结果表明(图 3), 3 批 9MW3311 及参比品与 S1-

RBD 的结合呈典型的“S”型曲线, EC_{50} 值分别为: 10.2、10.1、10.6、10.8 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与参比品相比较, 3 批 9MW3311 的相对结合活性高度一致, 分别为 101%、96% 及 100%。

3.2.2 流式细胞法 使用流式细胞法测定

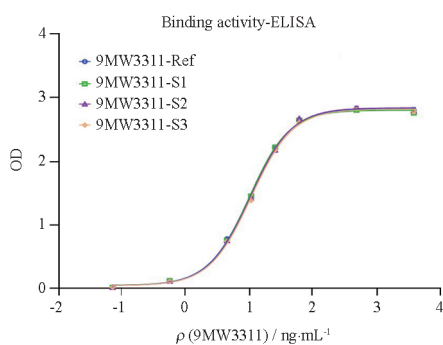
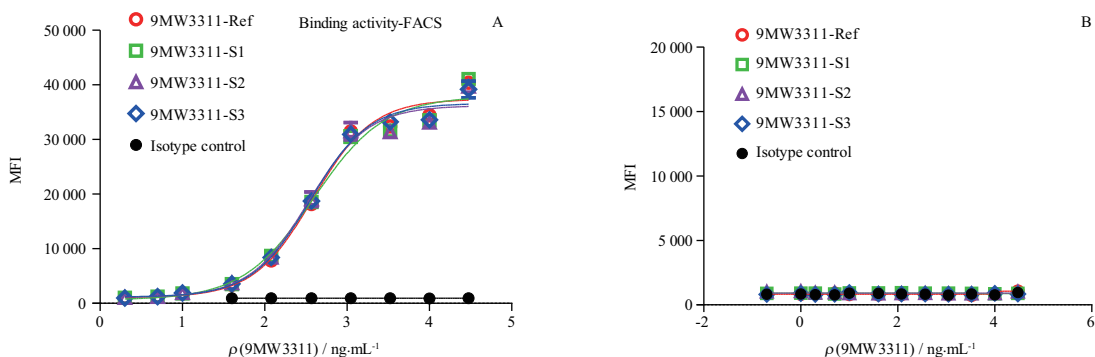


图3 3批9MW3311及参比品与S1-RBD的结合活性量效曲线

Fig. 3 Dose-effect curves of binding activity of three batches of 9MW3311 and reference to S1-RBD

9MW3311及其参比品与S蛋白在细胞水平的相对结合活性,结果表明(图4),9MW3311及其参比品与正常的HEK-293细胞不结合(图4B),而能与表面瞬时表达S蛋白的HEK-293细胞特异性结合(图4A), EC_{50} 值分别为387、393、343、360 $ng \cdot mL^{-1}$ 。且与参比品相比,3批9MW3311与S蛋白



A-3批9MW3311、参比品及阴性对照与瞬时表达S蛋白的HEK-293细胞的结合活性;B-3批9MW3311、参比品及阴性对照与HEK-293细胞的结合活性。

A-binding activity of 3 batches of 9MW3311, reference and isotype control with HEK-293 cells; B-binding activity of 3 batches of 9MW3311, reference and isotype control with HEK-293 cells transiently transfected S protein.

图4 3批9MW3311及参比品与S蛋白在细胞水平结合活性的量效曲线

Fig. 4 Dose-response curves of binding activity of three batches of 9MW3311 and reference with S protein at cell level

3.4 9MW3311在假病毒水平的体外细胞学活性

使用SARS-CoV-2假病毒系统检测9MW3311及其参比品的体外中和活性,结果表明(表1,图6),3批9MW3311及其参比品对假病毒均有较高的中和活性,且中和活性高度一致,分别为91%、93%及108%。

3.5 9MW3311抗体Fc与FcγR的亲合能力

使用Biacore法检测3批9MW3311及参比品与FcγR I/CD64, FcγR II a/CD32a, FcγR II b/CD32b, FcγR III a/CD16a亲和力结果表明(表2),3批

在细胞水平的结合活性高度一致,分别是98%、113%及108%。

3.3 9MW3311阻断S1-RBD与ACE2结合的活性

3.3.1 ELISA法 使用ELISA法测定9MW3311及其参比品阻断S1-RBD与ACE2的结合活性,结果表明(图5A),9MW3311抗体可以有效阻断S1-RBD抗原与ACE2受体的相对结合活性,且呈剂量依赖趋势,量效曲线符合倒“S”型, IC_{50} 值分别为:262、263、275、288 $ng \cdot mL^{-1}$,且3批9MW3311与参比品的阻断结合活性高度一致,分别为100%、95%和91%。

3.3.2 FACS法 使用FACS法测定9MW3311及其参比品在细胞水平阻断S1-RBD与ACE2的结合活性,结果表明(图5B),9MW3311抗体可以特异性阻断S1-RBD抗原与表达在HEK-293细胞表面的人ACE2受体的相对结合活性,而阴性对照则无阻断活性。 IC_{50} 值分别为428、457、422、453 $ng \cdot mL^{-1}$ 。且3批9MW3311的阻断结合活性与参比品高度一致,分别为94%、101%及94%。

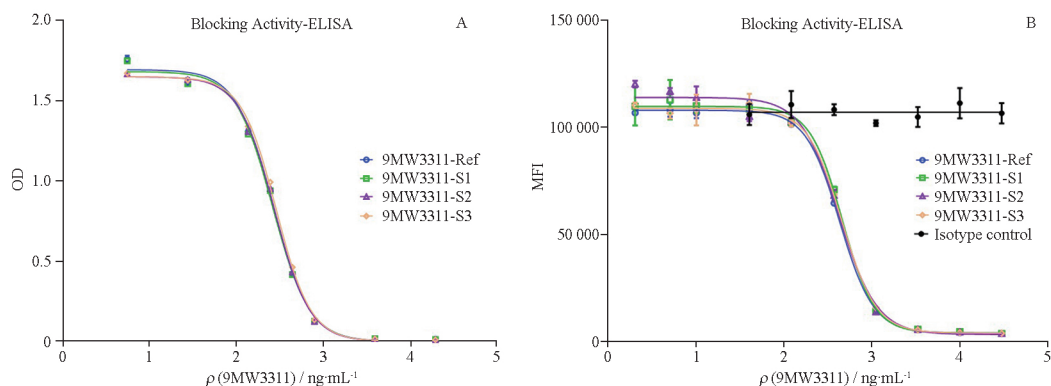
9MW3311与各Fcγ受体亲和力水平一致。

3.6 9MW3311抗体Fc与FcRn的亲合能力

使用Biacore法检测3批9MW3311及参比品与FcRn亲和力结果表明(表3),3批9MW3311与FcRn亲和力水平一致。

3.7 9MW3311抗体Fc端与C1q的结合活性

使用ELISA法检测3批9MW3311及参比品与C1q受体的结合活性,结果表明(图7),3批9MW3311及参比品与C1q受体都有较高的结合活性, EC_{50} 值分别为:3 862、3 868、4 010、



A - 酶联免疫吸附法 (ELISA) 在蛋白水平的阻断活性; B - 流式细胞技术 (FACS) 法在细胞水平的阻断活性。

A - ELISA at protein level; B - FACS at cell level.

图5 3批9MW3311及参比品阻断新型冠状病毒S糖蛋白-S1受体结合区域(S1-RBD)与血管紧张素转化酶2(ACE2)受体结合活性的量效曲线

Fig. 5 Dose-response curves of three batches of 9MW3311 and reference for blocking the binding activity of S1-RBD and ACE2

表1 3批9MW3311及其参比品的假病毒中和活性

Tab. 1 Neutralization activity of three batches of 9MW3311 and reference

Antibodies	IC ₅₀ /ng · mL ⁻¹		Activity /%
	9MW3311-Reference	Drug substance	
9MW3311-S1	26.73	29.44	91
9MW3311-S2	27.73	29.69	93
9MW3311-S3	28.80	26.67	108

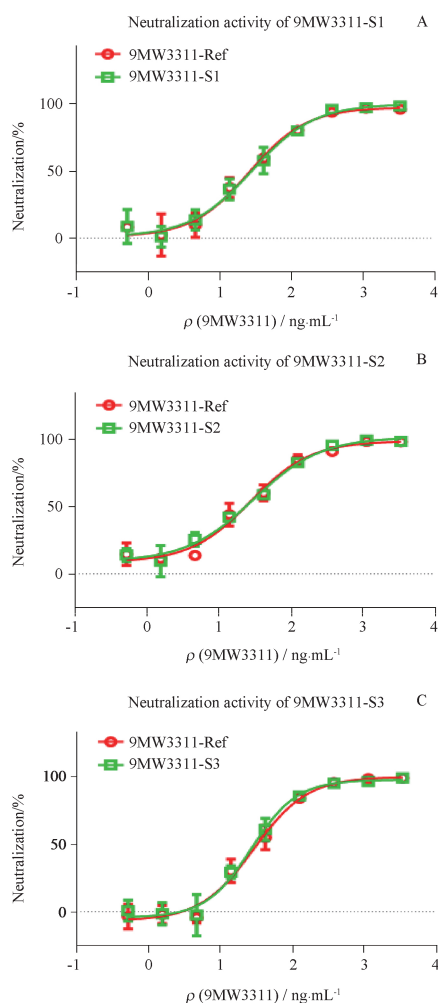
3 729 ng · mL⁻¹,且与参比品相比,3批9MW3311与C1q受体的结合活性高度相似,分别为100%,96%及104%。

3.8 9MW3311单抗的ADCC与CDC效应评价

以瞬转SARS-CoV-2 S蛋白全长基因的Expi293细胞作为靶细胞,采用PBMC法评价9MW3311单抗的ADCC效应;以混合健康人血清(pooled normal human serum,PNHS or NHS)作为血清补体成分的来源,评价9MW3311中和抗体的CDC效应。结果表明,与Herceptin阳性对照相比^[16],9MW3311中和抗体均无明显的ADCC(图8A)及CDC(图8B)效应。

3.9 MW3311单抗的ADE效应评价

参照对野生型的9MW3311单抗做了LALA突变(即重链242位和243位的亮氨酸L突变为丙氨酸A),以Raji细胞作为靶细胞,利用假病毒系统评估9MW3311野生型中和抗体和LALA突变型中和抗体的ADE效应,结果表明(图9),9MW3311野生型中和抗体在Raji细胞表面观察到在一定范围内有ADE效应的产生,LALA突变后的中和抗体可有效避免ADE效应。



A - 9MW3311-S1; B - 9MW3311-S2; C - 9MW3311-S3。

A - 9MW3311-S1; B - 9MW3311-S2; C - 9MW3311-S3.

图6 3批9MW3311及参比品的假病毒中和活性量效曲线

Fig. 6 Dose-effect curves of pseudovirus neutralization activity of three batches of 9MW3311 and reference

表2 3批9MW3311及其参比品与IgG Fc受体(FcγR)的亲和力常数

Tab. 2 Affinity and kinetic parameters of three batches of 9MW3311 and reference to FcγRs

Antibodies	KD/mol · L ⁻¹			
	FcγR I	FcγR II a	FcγR II b	FcγR III a
9MW3311-Ref	7.297 × 10 ⁻⁷	1.128 × 10 ⁻⁴	1.154 × 10 ⁻⁴	3.889 × 10 ⁻⁵
9MW3311-S1	6.214 × 10 ⁻⁷	1.507 × 10 ⁻⁴	2.450 × 10 ⁻⁴	4.268 × 10 ⁻⁵
9MW3311-S2	9.339 × 10 ⁻⁷	1.405 × 10 ⁻⁴	1.138 × 10 ⁻⁴	3.397 × 10 ⁻⁵
9MW3311-S3	7.719 × 10 ⁻⁷	1.383 × 10 ⁻⁴	1.596 × 10 ⁻⁴	3.520 × 10 ⁻⁵

表3 3批9MW3311及其参比品与新生儿Fc受体(FcRn)的亲和力常数

Tab. 3 Affinity and kinetic parameters of and reference 9MW3311 and reference to FcRn

Antigen	Antibodies	KD/mol · L ⁻¹
FcRn	9MW3311-Ref	1.241 × 10 ⁻⁶
	9MW3311-S1	1.152 × 10 ⁻⁶
	9MW3311-S2	1.277 × 10 ⁻⁶
	9MW3311-S3	1.338 × 10 ⁻⁶

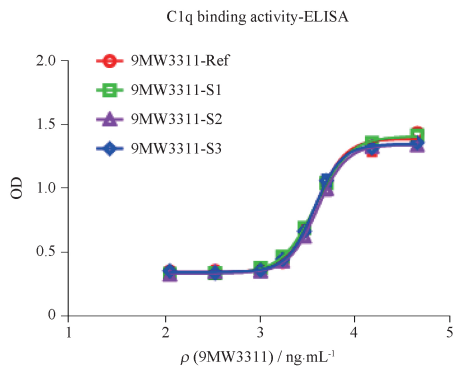
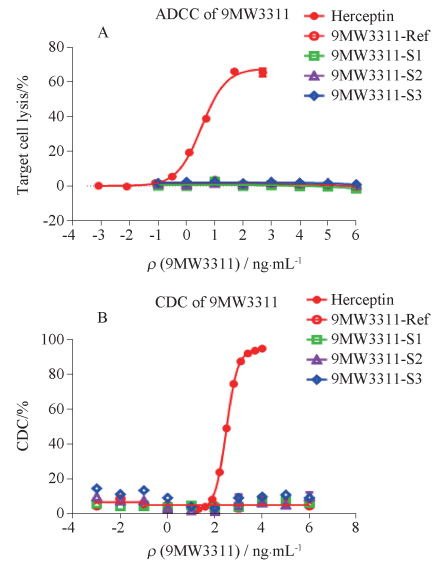


Fig. 7 Dose-response curves of binding activity of three batches of 9MW3311 and reference to C1q

Fig. 7 Dose-response curves of binding activity of three batches of 9MW3311 and reference to C1q

4 讨论

自 COVID-19 疫情暴发以来,国内多支科研团队及制药企业积极合作应对,充分利用之前 SARS-CoV 和 MERS-CoV 两种冠状病毒的研究基础,开发具有完全自主知识产权的特效药,迅速抢占 COVID-19 防治的最高阵地。这对我国疫情防控与治疗病症起到积极且重大的作用,同时,也为全球 COVID-19 的防治提供中国技术、中国方案,彰显了我国在新冠病毒防治中的积极姿态、先进技术,表现出负责任大国的应有作为,得到了世界人民的尊重与认可。作为最有希望的特效药之一,中和抗体药物也在新冠病毒防治中备受瞩目。目前,我国在该领域的研发和上市速度处于世界前列。

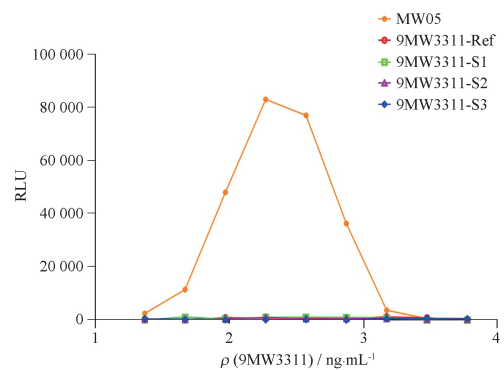


A - ADCC 效应量效曲线; B - CDC 效应量效曲线。

A - curve of ADCC effect; B - curve of CDC effect.

图8 9MW3311 单抗抗体的体依细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)及介导的细胞毒性作用(CDC)效应量效曲线

Fig. 8 Dose-response curves of ADCC and CDC effects of 9MW3311 mab



MW05 - 9MW3311 野生型抗体; 9MW3311-Ref, 9MW3311-S1, S2, S3 - LALA 突变抗体。

Wild type antibody of MW05 - 9MW3311; 9MW3311 - Ref, 9MW3311 - S1, S2, S3 - LALA mutant antibody.

图9 9MW3311 野生型单抗与 LALA 突变单抗的抗体依赖性感染增强作用(ADE)效应曲线

Fig. 9 ADE effect curves of wild-type 9MW3311 and LALA mutant

生物学活性和免疫学特性作为中和抗体的关键质量属性,直接反映中和抗体的有效性。本文从结合动力学、相对结合活性、ACE2 相对阻断活性及体外细胞学活性等 4 个方面对新型冠状病毒中和抗体 Fab 段的功能进行了分析研究。其中,采用 BLI 法测定中和抗体与抗原的结合动力学和亲和常数,该方法高效、敏感、可操作性强。分别采用 ELISA 法和 FACS 法测定中和抗体的相对结合活性,ELISA 法中,包被刺突蛋白受体结合区域蛋白片段作为抗原,用间接法检测不同浓度供试品与抗原的结合能力,通过参比品和样品 IC₅₀ 值的比值,从蛋白层面反映中和抗体和抗原的结合活性;FACS 中,通过将 S 蛋白瞬时表达在 HEK-293 细胞膜表面,可以得到更接近天然构象的 S 跨膜蛋白,检测中和抗体与瞬时表达 S 蛋白的 HEK-293 细胞的结合活性,从细胞水平反映中和抗体的结合活性,在结果处理时,均使用 SpectraMax 四参数软件进行拟合,进一步保证了结果的客观性和准确性。同样,使用 ELISA 法和 FACS 法测定 ACE2 相对阻断活性,ELISA 法中在酶标板上包被 ACE2 受体,再梯度稀释样品,将不同浓度的样品与一定量的 S 蛋白 RBD 等体积混合后,再通过竞争 ELISA 法检测不同浓度的混合后样品分别与 ACE2 受体结合的能力;FACS 法中分析中和抗体对表达在 HEK-293 细胞表面的人 ACE2 与 S 蛋白 RBD 结合的阻断活性。采用中检院自建的假病毒体系测定新型冠状病毒中和抗体的生物学活性^[17-18],Huh-7(人肝癌细胞系,可通过体外接种成功分离野生型 SARS-CoV-2 病毒株)^[19],模拟中和抗体阻断病毒感染宿主细胞的过程,该方法已用于新冠疫苗的放行检验,稳定性好,可靠性高。

从 Fc 与 Fc γ 受体、FcRn、C1q 受体的亲和力方面评价 Fc 段的免疫学特性,并测定中和抗体的 ADCC 和 CDC 效应。采用 SPR 法测定 Fc 与 Fc γ R I、Fc γ R II a、Fc γ R II b、Fc γ R III a 受体、FcRn 的亲合能力,将抗 HIS 抗体偶联在芯片表面,捕获 Fc γ R I、Fc γ R II a、Fc γ R II b、Fc γ R III a、FcRn 分别作为配体,以中和抗体为分析物,检测其亲和能力。采用 ELISA 法测定 Fc 与 C1q 的亲合能力。以瞬转 COVID-19 S 蛋白全长基因的 Expi293 细胞作为靶细胞,分别以赫赛汀 ADCC 和利妥昔 CDC^[20-21] 为阳性对照,建立测定中和抗体的 ADCC 和 CDC 效应的评价方法,采用 PBMC 法评价 ADCC 效应,以 PNHS 或 NHS 作为血清补体成分的来源,评价

CDC 效应,结果表明该中和抗体无明显的 ADCC 与 CDC 效应。

以 Raji 细胞作为靶细胞,利用假病毒系统建立了新型冠状病毒中和抗体 ADE 效应评价方法,并采用该方法分别对同一个中和抗体野生型和 LALA 突变体进行了评价,结果表明在一定范围内野生型中和抗体有 ADE 效应的产生,而 LALA 突变后的抗体分子则无 ADE 效应,后续将进行该方法的完善和验证,有望开发为平台方法,用于新型冠状病毒中和抗体及疫苗开发中 ADE 效应的评价。

本文使用多种方法从不同层面分别对新型冠状病毒中和抗体的生物学活性和免疫学特性进行了评价,并对 ADE 效应建立了灵敏、高效的评价方法,为突发状况下新型冠状病毒疫情防控提供了用药储备的技术支持,也为其他组合抗体的生物学和免疫学特性评价,质量控制和放行提供了参考。

REFERENCES

- [1] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798):270-273.
- [2] NAINU F, ABIDIN R S, BAHAR M A, *et al.* SARS-CoV-2 reinfection and implications for vaccine development [J]. *Hum Vaccines Immunother*, 2020, 16(12):3061-3073.
- [3] WANG S, WANG G Z, TANG T, *et al.* Research progress on pathogenesis and drug treatment of novel coronavirus pneumonia. [J]. *Shaanxi Med J* (陕西医学杂志), 2021, 50(5): 638-641.
- [4] WALLS A C, PARK Y J, TORTORICI M A, *et al.* Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein [J]. *Cell*, 2020, 181(2):281-292.
- [5] LETKO M, MARZI A, MUNSTER V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(4):562-569.
- [6] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181(2):271-280.
- [7] TIAN X, LI C, HUANG A, *et al.* Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 382-385.
- [8] ZHOU G, ZHAO Q. Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the novel coronavirus SARS-CoV-2 [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(10):1718-1723.
- [9] ITA K. Coronavirus disease (COVID-19): current status and prospects for drug and vaccine development [J]. *Arch Med Res*, 2021, 52(1):15-24.
- [10] YU D L, HUANG C J, WANG M X. Research progress on Fc

- function and engineering modification of therapeutic monoclonal antibody [J]. *Chin J Histochem Cytochem*(中国组织化学与细胞化学杂志), 2019, 28(6):552-559.
- [11] DALL'ACQUA W F, KIENER P A, WU H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn) [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(33):23514-23524.
- [12] KARTHIK K, SENTHILKUMAR T M A, UDHAYAVEL S, *et al.* Role of antibody-dependent enhancement (ADE) in the virulence of SARS-CoV-2 and its mitigation strategies for the development of vaccines and immunotherapies to counter COVID-19 [J]. *Hum Vaccines Immunother*, 2020, 16(12):3055-3060.
- [13] MAGNANI D M, RICCIARDI M J, BAILEY V K, *et al.* Dengue virus evades AAV-mediated neutralizing antibody prophylaxis in rhesus monkeys [J]. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*, 2017, 25(10):2323-2331.
- [14] 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):120-124.
- [15] WANG S, PENG Y, WANG R, *et al.* Characterization of neutralizing antibody with prophylactic and therapeutic efficacy against SARS-CoV-2 in rhesus monkeys [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):57-52.
- [16] COLLINS D M, O'DONOVAN N, MCGOWAN P M, *et al.* Trastuzumab induces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in HER-2-non-amplified breast cancer cell lines [J]. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*, 2012, 23(7):1788-1795.
- [17] NIE J, LI Q, WU J, *et al.* Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2 [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1):680-686.
- [18] NIE J, LI Q, WU J, *et al.* Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by a pseudotyped virus-based assay [J]. *Nat Protoc*, 2020, 15(11):3699-3715.
- [19] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, *et al.* Addendum: a pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 588(7836):270-273.
- [20] VAN MEERTEN T, VAN RIJN R S, HOL S, *et al.* Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity [J]. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*, 2006, 12(13):4027-4035.
- [21] GAZZANO-SANTORO H, RALPH P, RYSKAMP T C, *et al.* A non-radioactive complement-dependent cytotoxicity assay for anti-CD20 monoclonal antibody [J]. *J Immunol Methods*, 1997, 202(2):163-171.

(收稿日期:2023-01-30)