恒河猴血清中预存抗 AAV8 衣壳总抗体检测方法的建立与确认

霍一凡[1,2]，徐嘉辰[2]，黄美晴[2]，王国凤[2]，邱云良[2*]

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203）

摘要：随着基于腺相关病毒（AAV）基因治疗的显著发展，一项重要的任务是开发简便、快速且可靠的检测 AAV 预存抗体的方法。该研究基于酶联免疫吸附试验（ELISA），将 AAV8 衣壳包被于 96 孔板，采用重组蛋白 A/G 为检测抗体，建立了一种简单、快速检测恒河猴血清中抗 AAV8 衣壳总抗体（TAb）的方法，并对其进行方法学验证。结果表明，该方法的乘法校正因子为 1.08，确证临界值为 29.5%；筛选和确证灵敏度分别为 43.1、76.5 ng/mL。1 000、100、50 ng/mL 的阳性对照抗体可耐受 AAV8 滴度分别为 1.25×10^{10}、3.13×10^{9}、1.56×10^{9} GC/mL。批内、批间变异系数（CV）≤ 20.0%。此外，本方法有足够的选择性和样本稳定性，可用于恒河猴血清中预存抗 AAV8 衣壳 TAb 的检测。

关键词：AAV8；免疫原性；预存抗体；总抗体；ELISA

中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)06-0851-09

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.06.016

Establishment and Confirmation of a Method for Detection of Total Anti-capsid of AAV8 Antibodies in Serum of Rhesus Monkeys

HUO Yifan[1,2], XU Jiachen[2], HUANG Meiqing[2], WANG Guofeng[2], QIU Yunliang[2*]

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: With the development of gene therapy based on adeno-associated virus (AAV), an important task is to develop a simple, rapid and reliable method for detecting pre-existing anti-AAV antibodies. In this study, a simple and rapid method for the detection of total antibodies (TAb) against AAV8 capsid in serum of rhesus monkeys was developed and confirmed. This method based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and AAV8 capsid was coated on 96-well plate, recombinant protein A/G was used as the detection antibody. The results showed that the multiplicative correction factor of this assay was 1.08 and confirmatory cut point was 29.5%. The screening and confirmatory sensitivities were 43.1 and 76.5 ng/mL, respectively. The positive controls of 1 000, 100, 50 ng/mL were tolerant to 1.25×10^{10}, 3.13×10^{9}, 1.56×10^{9} GC/mL AAV8, respectively. Both the coefficients of variation (CV) of intra-run and inter-run met CV ≤ 20.0 %. In addition, the method has sufficient selectivity and sample stability, which can be used for TAb detection of pre-existing anti-AAV8 capsid in serum of rhesus monkeys.

Key Words: AAV8; immunogenicity; pre-existing antibody; total antibodies; ELISA

近年来，基因治疗的飞速发展为人类治愈多种遗传疾病、恶性肿瘤等疑难杂症带来了新希望。其中，基于腺相关病毒（adeno-associated virus，AAV）的基因治疗以重组 AAV 为基因递送载体，发展显著。作为基因治疗载体的重组 AAV 以野生型 AAV 基因组为骨架进行构建，仅保留基因组两端的反向末端重复序列而不表达任何病毒蛋白，因此安全性较其他病毒载体高[1]。使用不同血清型 AAV 作为基因递送载体治疗多种疾病的数百项临床试验数据，让研究者看到了成功的希望，同时也吸引了更多关

收稿日期：2023-11-30

基金项目：上海市科委工程技术研究中心专项（17DZ2252900）

作者简介：霍一凡（1995—），女，硕士研究生，专业方向：临床前 / 临床免疫原性、生物标志物分析。

通信作者：邱云良（1978—），男，研究员，博士生导师，从事免疫原性、药物毒理学、生物标志物及非临床依赖性的研究。

E-mail：ylqiu@innostar.cn

注[2—4]。随着 Luxturna 和 Zolgensma 相继被监管机构批准上市，人们对于开发基于 AAV 载体的基因治疗产品产生了较大的兴趣[4—5]。2022 年，EMA 批准了 3 款 AAV 基因治疗产品（Upstaza、Roctavian 和 Hemgenix）上市。2023 年 6 月，FDA 批准了 Sarepta Therapeutics 公司与罗氏联合开发的 Elevidys 上市。

然而，AAV 作为基因治疗载体面临一个重大挑战，即其免疫原性[5]。由于其病毒性质，给药后重组 AAV 可以通过 Toll 样受体刺激先天性免疫反应，同时引起体液和细胞免疫反应并形成免疫记忆[6—7]。事实上，野生型 AAV 的感染非常普遍。由于暴露于野生型 AVV，人类和一些动物体内存在抗野生型 AAV 衣壳的抗体，即相当一部分人在生命早期就对 AAV 衣壳产生了体液免疫。近年来，对于 AAV 衣壳预先存在以及治疗引起的体液和细胞反应都已有许多报道[8—9]。预存抗体，特别是中和抗体（neutralizing antibody，NAb）的存在，不仅会对 AAV 基因治疗药物的临床疗效产生显著影响，而且有可能导致给药后免疫反应加剧，造成严重不良反应。这是迄今为止 AAV 基因治疗的最大挑战，也是早期临床试验失败的主要因素[10]。多项研究表明，NAb 可以抑制全身注射 AAV 载体介导的基因转导[11]，即使低滴度的抗 AAV 衣壳 NAb 也会抑制 AAV 在小鼠、非灵长类以及人类体内的转导，降低转基因表达的效率；注射相对高剂量的 AAV 载体时，较低水平的 NAb 也可以抑制其转导。此外，预存抗体有可能导致给药后免疫反应加剧，引发严重不良反应[12—13]。因此，在筛选入组之前对患者体内预存抗体进行筛查以排除 NAb 阳性患者，以及给药后监测抗体水平以进行免疫原性检测，均至关重要[5,12—13]。

目前，检测抗 AAV 衣壳 NAb 的方法主要有 2 种，即检测抗 AAV 衣壳总抗体（total antibodies，TAb），以及基于细胞法的 AAV 转导抑制试验以检测抗 AAV 衣壳 NAb。研究[8,14]表明，健康人和患者体内的 TAb 滴度和 NAb 滴度之间存在很强的相关性，并且依据抗 AAV 衣壳 TAb 测定结果足以在 AAV 基因治疗试验中对患者进行筛选[13]。目前没有监管要求需要将两者都包括在内以支持临床开发，因此多数研究者选择 TAb 法进行预存抗体筛查[15]。

本研究建立了一种基于酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）法检测恒河猴血清中抗 AAV8 衣壳 TAb 的方法，并对该方法的临界值、方法灵敏度、药物耐受性、精密度、选择性以及样本稳定性进行考察。同时，为确定该方法的适用性，分别使用该方法检测恒河猴血清样本中抗 AAV2、AAV5、AAV8、AAV9 衣壳 TAb，以期为临床前或临床研究中 AAV 预存抗体的快速筛查提供参考。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Molecular Devices SpectraMax® i3x 型多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）。

1.2　试剂

1.2.1　恒河猴血清

本研究检测的恒河猴血清均购自新野县新豫野生动物养殖有限公司。将筛选所得的阴性个体血清混合以制备阴性血清，并将阴性血清作为每个分析批中的阴性对照（negative control，NC）。

1.2.2　AAV8 衣壳

本研究使用的 AAV8、AAV2、AAV5、AAV9 衣壳均为完整空衣壳，不含目的基因，滴度为 1×10^{13} GC/mL。所有 AAV 空衣壳均购自广州派真生物技术有限公司，通过三质粒共转染 HEK293 细胞构建，通过 qPCR 定量、SDS-PAGE 电泳与考马斯亮蓝染色确定纯度。用 PBS（1×）将其稀释至 1.25×10^{8} GC/mL 作为包被液，用酪蛋白封闭缓冲液将其稀释至 1×10^{11} GC/mL 作为抑制剂。

1.2.3　阳性对照抗体

本研究使用小鼠抗 AAV8（完整衣壳）单克隆抗体（德国 Progen 公司，批号 610160S）作为阳性对照（positive control，PC）抗体，用阴性血清将 PC 分别稀释至 1 000 ng/mL 作为高质量浓度阳性对照（high positive control，HPC）抗体、100 ng/mL 作为中质量浓度阳性对照（middle positive control，MPC）、50 ng/mL 作为低质量浓度阳性对照（low positive control，LPC）抗体。

1.2.4 检测抗体

本研究选用过氧化物酶偶连重组蛋白 A/G（美国 Thermo Scientific 公司，批号 32490）作为检测抗体，蛋白 A/G 包含蛋白 A 的 4 个 Fc 结合结构域和蛋白 G 的 2 个 Fc 结合结构域，能结合所有 IgG 亚类、IgA、IgE、IgM，并能在较小程度上结合 IgD。用低交叉反应缓冲液将其稀释至 0.5 μg/mL 作为检测抗体。

1.2.5 普通试剂

本研究涉及的普通试剂包括：酪蛋白封闭缓冲液（美国 Thermo Scientific 公司，批号 37528）；低交叉反应缓冲液（德国 Candor 公司，批号 100500）；3,3',5,5'- 四甲基联苯胺（TMB）单组分显色液（北京索莱宝科技有限公司，批号 PR1200）；PBS（1×）（美国 Corning 公司，批号 21-040-CVC）；0.05% PBST（磷酸盐吐温缓冲液）和终止液（自制 2 mol/L 硫酸溶液）。

2 方法与结果

2.1 抗 AAV8 衣壳 TAb 的检测方法

向 96 孔板中每孔加入包被液 100 μL，于 2 ～ 8 ℃过夜孵育；用 0.05% PBST 洗板 3 次后，板中每孔加入酪蛋白封闭缓冲液 300 μL，于 25 ℃条件下封闭 2 h；洗板 3 次后，板中每孔加入稀释后的血清样品 100 μL，于 25 ℃、600 r/min 的条件下振荡孵育 2 h；洗板 3 次后，板中每孔加入检测抗体 100 μL，于 25 ℃、600 r/min 的条件下振荡孵育 1 h；再次洗板 3 次后，板中每孔加入 TMB 单组分显色液 100 μL，于 25 ℃条件下避光孵育 25 min，最后每孔加入终止液 100 μL 终止反应，并在酶标仪中于 450 或 570 nm 波长下检测读数。

2.2 样品前处理

本研究所有样品采用的最小稀释倍数为 20 倍。筛选样品进板前用酪蛋白封闭缓冲液稀释 20 倍，确证样品用酪蛋白封闭缓冲液稀释 10 倍后与抑制剂 1 ∶ 1 混合，并于 25 ℃、600 r/min 的条件下振荡孵育 2 h。

2.3 筛选临界值（screen cut point，SCP）和确证临界值（confirmatory cut point，CCP）的确定

SCP 和 CCP 通过对阴性恒河猴血清样本的重复测定确定。SCP 用于初步判定待测样本为阴性或“疑似阳性”，CCP 用于确认筛选试验中“疑似阳性”样品是否为阳性。样本信号值大于 SCP 即判定为筛选阳性，样本信号抑制率（signal inhibition rate，SIR）大于 CCP 即被判定为确证阳性。

阴性样本重复测定 3 次后，将个体信号值（*S*）进行背景降噪处理，即用 *S* 除以所在批次 NC 样本信号值（*N*），用 *S*/*N* 进行乘法校正因子（multiplicative correction factor，MCF）的统计和计算。对于正态分布的情况，MCF 计算如式①所示，SCP 采用浮动筛选临界值（$SCP_{floating}$）（式②）。在阴性样本中加入抑制剂（1×10^{11} GC/mL 的 AAV8），重复测定 3 次，通过计算样本的 SIR（式③）确定 CCP。对于正态分布的情况，CCP 的计算如式④所示。计算 SCP 和 CCP 前，通过 Tukey 检验，排除 *S*/*N* 或 SIR 的离群值，即大于 *Q*3+1.5×（*Q*3 – *Q*1）或小于 *Q*1 – 1.5×（*Q*3 – *Q*1）的值，其中 *Q*1 为第一个四分之一百分位数，*Q*3 为第三个四分之一百分位数。

$$MCF=Mean_{(S/N)}+1.645\times SD_{(S/N)}\ (95\%\text{百分位数}) \quad ①$$

$$SCP_{floating}=MCF\times \text{信号值}_{NC} \quad ②$$

$$SIR=\left(1-\frac{\text{加抑制剂个体信号值}}{\text{未加抑制剂个体信号值}}\right)\times100\% \quad ③$$

$$CCP=Mean_{(SIR)}+2.326\times SD_{(SIR)}\ (99\%\text{百分位数}) \quad ④$$

本研究对 16 个阴性恒河猴血清样本分别进行 3 次筛选试验和确证试验。对 *S*/*N* 值进行 Tukey 检验，剔除 4 个离群值后，对剩余 12 个样本的 *S*/*N* 值进行 Shapiro-Wilk 检验。结果显示，数据呈正态分布（*P*>0.05 且 |skewness|<1，图 1），计算得 MCF=1.08（式①），SCP 采用浮动临界值 $SCP_{floating}$。同样，对样本 SIR 值进行 Tukey 检验、Shapiro-Wilk 检验后，剔除 4 个离群值，剩余数据呈正态分布（*P*>0.05 且 |skewness|<1，图 2），计算得 CCP=29.5%（式④）。

2.4 阴性样本筛选

由于预存抗体的存在，在确定方法 SCP 或者 CCP 之前，需要进行阴性样本筛选。本研究对 50 个健康恒河猴血清样本分别进行筛选试验和确证试验，采用 GOROVITS 等 [15] 提出的方法，将 SIR<50%的样本定义为阴性样本。检测结果显示，在 50 个样本中，阴性样本（SIR<50%）共 16 个（图 3），将筛选所得的阴性样本用于后续试验。

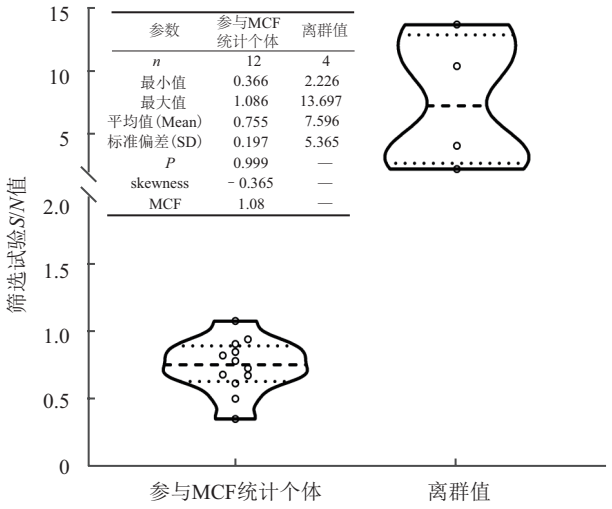


图 1　筛选试验结果

Fig.1　Results of Screening Assay

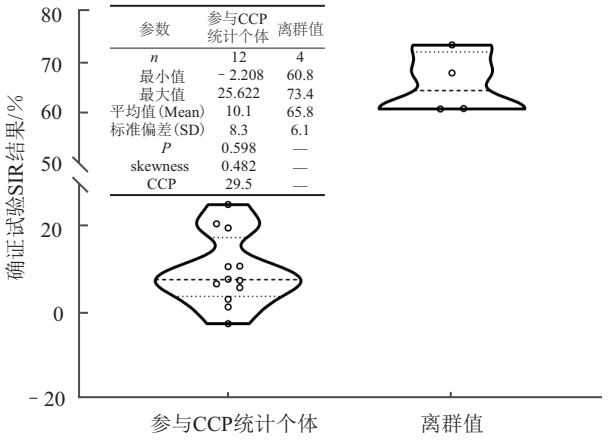
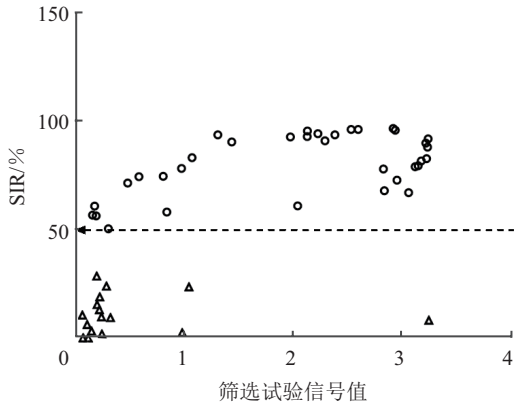


图 2　确证试验结果

Fig.2　Results of Confirmatory Assay



○—SIR ≥ 50%；△—SIR<50%。

图 3　阴性样本筛选结果

Fig.3　Screening Results of Negative Samples

2.5　方法灵敏度

用阴性血清将 PC 抗体梯度稀释至 1 000、500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.81 ng/mL 作为阳性滴度曲线，同时进行筛选和确证试验（加入抑制剂），考察方法灵敏度。以质量浓度为横坐标、信号值为纵坐标，通过四参数回归模型来拟合，需满足相关系数 $R^2 \geqslant 0.99$。同时用阴性血清将 PC 抗体稀释至高于 HPC 抗体的质量浓度（5 000、4 000、2 000、1 250 ng/mL），考察钩状效应。质量浓度高于 HPC 抗体的样品的信号值，相比于相邻低质量浓度样品应没有显著降低且高于 HPC 抗体。

方法灵敏度（包括筛选灵敏度和确证灵敏度）的确定根据所有符合接受标准的阳性滴度曲线上 $SCP_{floating}$ 及 CCP 对应的浓度计算（式⑤和⑥）。

$$\text{筛选灵敏度} = Mean_{(SCP_{floating}\text{ 对应浓度})} + t_{0.05,df} \times SD_{(SCP_{floating}\text{ 对应浓度})} \quad ⑤$$

$$\text{确证灵敏度} = Mean_{(CCP\text{ 对应浓度})} + t_{0.05,df} \times SD_{(CCP\text{ 对应浓度})} \quad ⑥$$

方法灵敏度即 PC 样品检测结果持续为阳性的最低浓度。本研究共统计 9 条筛选滴度曲线（图 4）和 6 条确证滴度曲线（图 5），计算得本方法筛选灵敏度为 43.1 ng/mL（20 倍稀释后为 2.16 ng/mL），确证灵敏度为 76.5 ng/mL（20 倍稀释后为 3.83 ng/mL）。钩状效应检测结果（图 6）显示，质量浓度高于 HPC 抗体的样品的信号值相比于相邻低浓度样品的信号值，没有显著降低且高于 HPC 抗体的信号值，即在 1 250～5 000 ng/mL 内不存在影响检测的钩状效应。

2.6　药物耐受性试验

用阴性血清稀释 AAV8 至 1×10^{11}、5×10^{10}、2.5×10^{10}、1.25×10^{10}、6.25×10^{9}、3.13×10^{9}、1.56×10^{9}、7.81×10^{8} GC/mL，同时用阴性血清稀释 PC 抗体至 2 000、200、100 ng/mL。将该系列浓度 AAV8 溶液分别与不同质量浓度 PC 样品 1 ∶ 1 混合均匀后，于 25 ℃孵育 1 h（AAV8 及 PC 样品均被稀释 2 倍），在超低温冰箱（－70～－90 ℃）中冷冻至少 12 h，室温解冻、混匀后进行测定。在不同质量浓度 PC 存在的情况下，信号值 ≥ $SCP_{floating}$ 所对应的最高 AAV8 浓度即为该质量浓度 PC 样品能够耐受的最大药物浓度。

样本中游离的药物可与捕获试剂 / 检测试剂竞

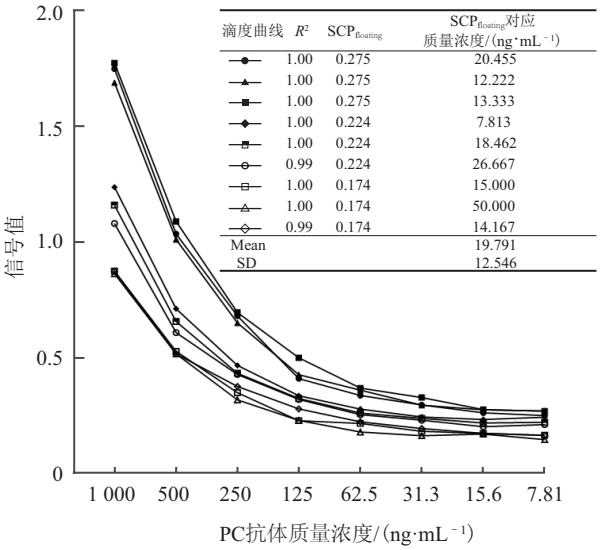


图 4 筛选试验灵敏度

Fig.4 Sensitivity of Screening Assay

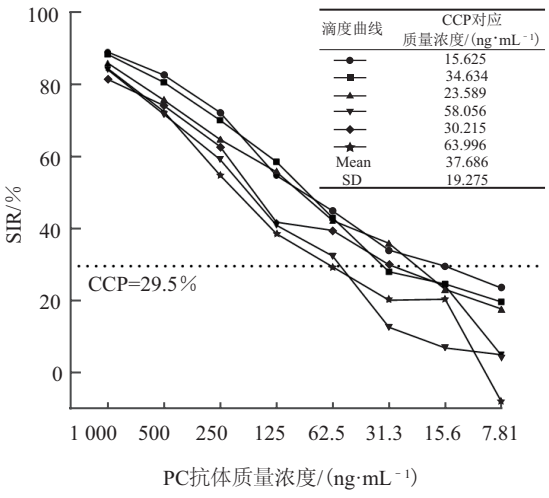


图 5 确证试验灵敏度

Fig.5 Sensitivity of Confirmatory Assay

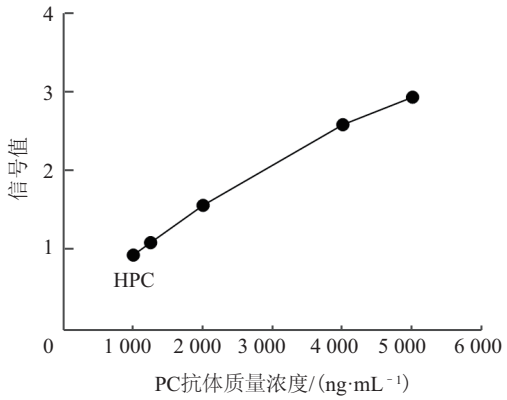


图 6 钩状效应结果

Fig.6 Results of Hook Effect

争抗衣壳抗体，干扰检测结果，导致出现假阴性的结果。在大多数情况下，血液循环中会存在一定量的药物，而药物的存在可能会与捕获试剂 / 检测试剂竞争抗衣壳抗体，干扰检测结果，导致假阴性[5]。本研究药物耐受性样品所在分析批的 $SCP_{floating}$ 为 0.199（即信号值 >0.199）时，所对应的 AAV8 最高滴度就是该 PC 样品能够耐受的最大药物浓度。验证结果显示（图 7），PC 质量浓度为 1 000、100、50 ng/mL 时，可耐受 AAV8 的滴度分别为 1.25×10^{10}、3.13×10^{9}、1.56×10^{9} GC/mL。

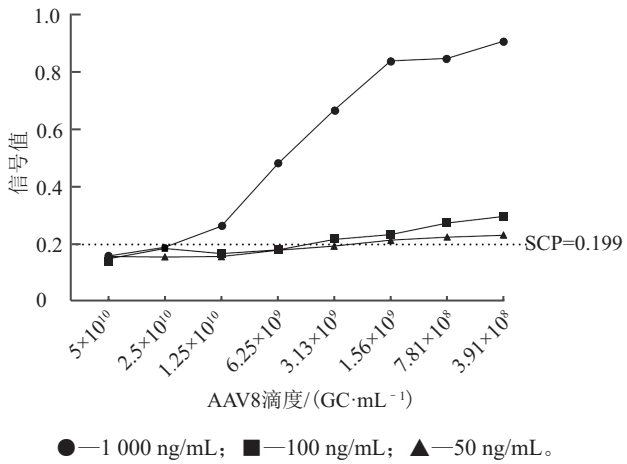


图 7 药物耐受性结果

Fig.7 Results of Drug Tolerance

2.7 批内、批间精密度试验

用阴性血清稀释 PC 抗体至 HPC、MPC、LPC，分别加入抑制剂考察确证精密度、不加入抑制剂考察筛选精密度。本研究将精密度表示为变异系数（coefficient of variation，CV）。筛选精密度各浓度样品信号值均值需满足批内 HPC>MPC>LPC> $SCP_{floating}$>NC，且批内及批间 CV ≤ 20.0%；确证精密度各浓度样品 SIR 均值需满足批内 HPC>MPC>LPC>CCP，且批内及批间 CV ≤ 20.0%。

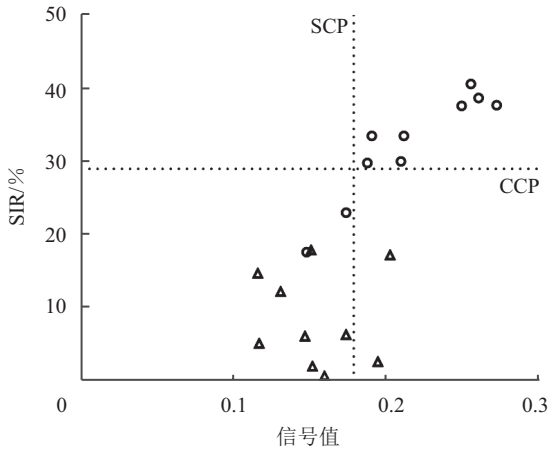
为考察该方法在不同时间、不同分析批以及不同分析人员之间的精密度，本研究由 2 名分析人员在 3 个不同日期对精密度样品进行筛选试验和确证试验，以考察方法的精密度。验证结果显示，样本信号值和 SIR 的批内 CV 分别为 2.4%～14.9%、1.5%～19.7%，批间 CV 分别为 6.0%～16.8%、

2.7%～19.7%，表明本方法具有较好的精密度。

2.8 选择性试验

选择性是指该方法能够在样本中存在其他成分的情况下，检测出特异性抗 AAV8 衣壳抗体的能力。选择 10 个阴性恒河猴血清样本作为稀释液，分别稀释 PC 抗体至 LPC，进行筛选（不加入抑制剂）和确证（加入抑制剂）分析，同时检测阴性个体血样以评价方法的选择性。需至少 80%含 LPC 浓度水平 PC 抗体的血清样品筛选、确证均为阳性；至少 80%阴性个体血清筛选或确证为阴性（若筛选结果为阳性，需计算 SIR 且 SIR 应≤ CCP）。

验证结果显示（图 8），有 80%个体稀释的 LPC 样品筛选、确证结果均为阳性，80%个体血清筛选为阴性且 20%筛选为阳性的样本确证为阴性。



○—LPC 样品 + 阴性个体血样；△—阴性个体血样。

图 8　选择性结果

Fig.8　Results of Selectivity

2.9 稳定性试验

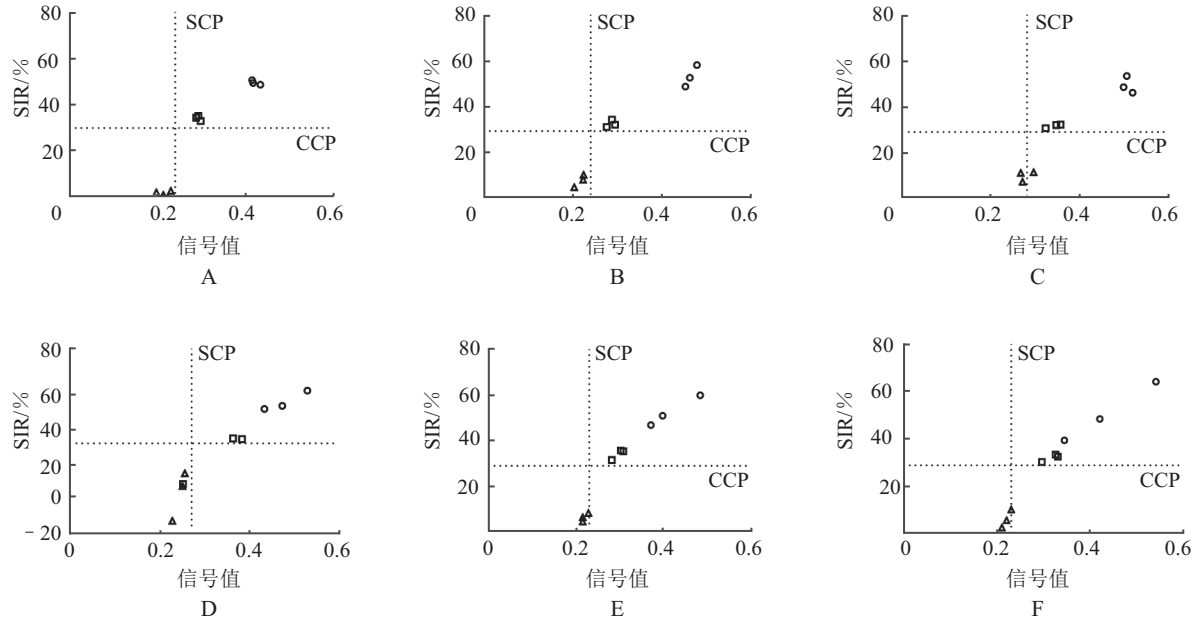
因样本实际检测过程中存在多种限制因素，导致新鲜样本难以获得或需要重复检测等，所以需要对样本的稳定性进行评估。本研究模拟多种样本保存及处置情况以考察样本稳定性。用阴性血清将 PC 抗体稀释至 HPC、LPC，另取 NC（即阴性血清），分别在新鲜配制、室温及 2～8 ℃放置、用酪蛋白封闭缓冲液稀释 20 倍后室温放置、冻融 3 次和 6 次后，进行筛选（不加入抑制剂）和确证（加入抑制剂）分析。每个处理条件下至少 2/3 的稳定性样本需满足以下接受标准：(1) HPC、LPC 样品应被判定为筛选和确证阳性；(2) NC 样品被判定为筛选或确证为阴性（若筛选结果为阳性，需计算 SIR 且 SIR 应≤ CCP）。

验证结果显示（图 9），新鲜配制、用酪蛋白封闭缓冲液稀释后室温放置 2.5 h 后所有 HPC、LPC 样品的筛选和确证结果均为阳性，NC 样品的筛选和确证结果均为阴性；2～8 ℃放置 25 h 后，所有 HPC、LPC 样品的筛选和确证结果均为阳性，2/3 的 NC 样品的筛选和确证结果均为阴性，筛选为阳性的 NC 样品被确证为阴性；室温放置 25 h 后，所有 HPC 样品的筛选和确证结果均为阳性，2/3 的 LPC 样品的筛选和确证结果均为阳性，所有 NC 样品的筛选和确证结果均为阴性；冻融 3 次和冻融 6 次后，所有 HPC、LPC 样品的筛选和确证结果均为阳性，2/3 的 NC 样品筛选和确证均为阴性，筛选为阳性的 NC 样品被确证为阴性。

2.10 恒河猴血清样品测定

本研究使用建立的方法检测 50 个恒河猴血清样本中的抗 AAV8 衣壳 TAb（图 10A），其中 $SCP_{floating}$=0.270，CCP=29.5%。50 个样本中，14 个样本筛选阴性（28%），36 个样本筛选阳性（72%）；16 个样本确证阴性（32%），34 个样本确证阳性（68%）；其中，14 个筛选阴性的样本中有 12 个被确证为阴性（85.7%），36 个筛选阳性的样本中有 32 个也被确证为阳性（88.9%），且 34 个确证阳性样本中 32 个也为筛选阳性（94.1%）。

为了考察该方法是否适用于检测血清中抗其他血清型 AAV 衣壳 TAb，本研究使用 AAV2、AAV5、AAV9 衣壳作为包被液和抑制剂，分别检测了 50 个恒河猴血清样本中抗 AAV2（图 10B）、抗 AAV5（图 10C）以及抗 AAV9（图 10D）衣壳 TAb。在抗 AAV2 衣壳 TAb 检测中，$SCP_{floating}$=0.396，CCP=57.0%；50 个样本中，22 个样本为筛选阴性（44%），28 个样本为筛选阳性（56%）；30 个样本为确证阴性（60%），20 个样本为确证阳性（40%）；其中，22 个筛选阴性样本中有 21 个被确证为阴性（95.5%），28 个筛选阳性样本中有 19 个也被确证



A—新鲜配制；B—用酪蛋白封闭缓冲液稀释后室温放置 2.5 h；C—2 ～ 8 ℃放置 25 h；D—室温放置 25 h；E—冻融 3 次；F—冻融 6 次。○—HPC；□—LPC；△—NC。

图 9 稳定性试验结果

Fig.9 Results of Stability Test

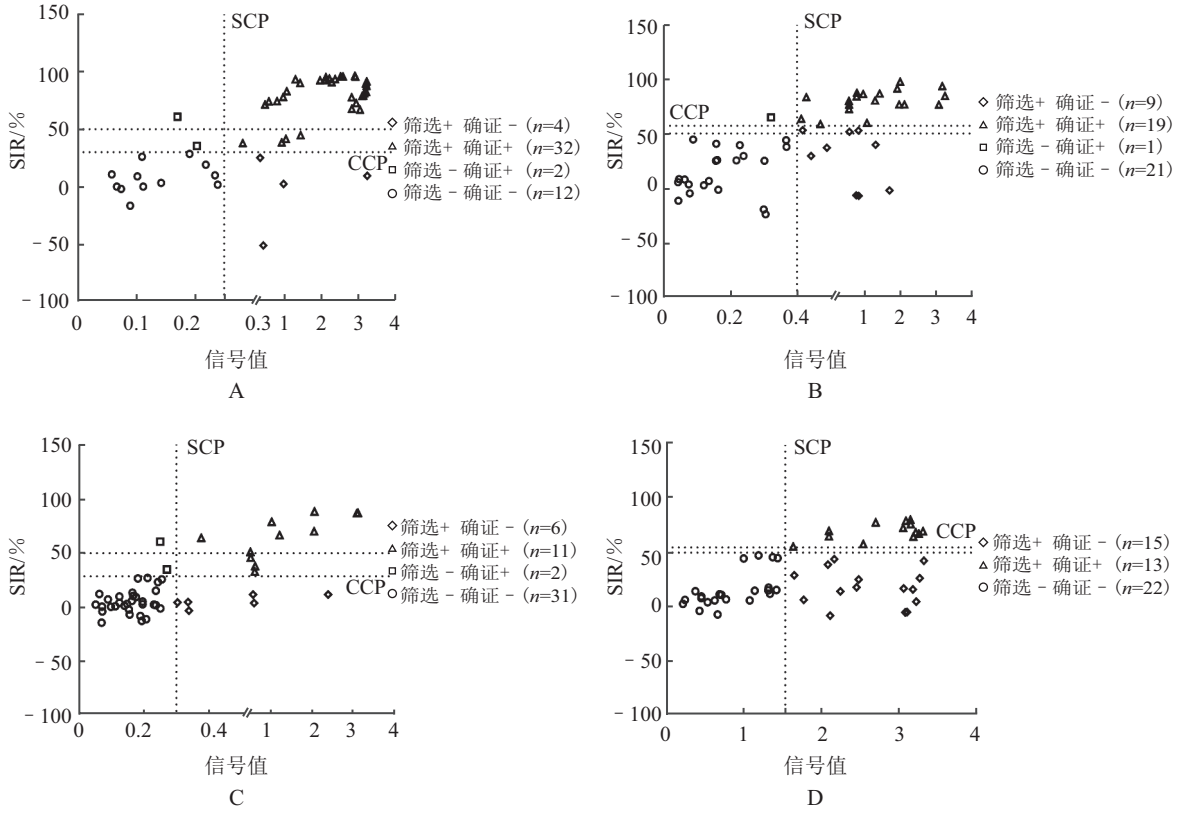
为阳性（67.9%），且 20 个确证阳性样本中有 19 个也为筛选阳性（95%）。

在抗 AAV5 衣壳 TAb 检测中，$SCP_{floating}$=0.302，CCP=28.8%；在 50 个样本中，33 个样本为筛选阴性（66%），17 个样本为筛选阳性（34%）；37 个样本为确证阴性（74%），13 个样本为确证阳性（26%）；其中，33 个筛选阴性样本中有 31 个也为确证阴性（93.9%），17 个筛选阳性样本中有 11 个也为确证阳性（64.7%），且 13 个确证阳性样本中有 11 个也为筛选阳性（84.6%）。

在抗 AAV9 衣壳 TAb 检测中，$SCP_{floating}$=1.533，CCP=54.8%；在 50 个样本中，22 个样本为筛选阴性（44%），28 个样本为筛选阳性（56%）；37 个样本为确证阴性（74%），13 个样本为确证阳性（26%）；其中，22 个筛选阴性样本均为确证阴性，28 个筛选阳性的样本中有 13 个也为确证阳性（46.4%），且 13 个确证阳性样本均为筛选阳性。

3 讨论

本研究建立了一种基于 ELISA 法检测抗 AAV8 衣壳 TAb 的方法。该方法将 AAV8 完整衣壳包被于 96 孔板，使用重组蛋白 A/G 作为检测抗体，效果不仅简单、快速，而且因重组蛋白 A/G 能结合所有 IgG 亚类、IgA、IgE、IgM，故可用于多种血清型衣壳 TAb 检测。同时，对该方法进行包括临界值、方法灵敏度、药物耐受性、精密度、选择性以及稳定性在内的验证。首先使用 GOROVITS 等 [15] 提出的方法，筛选出 16 个 SIR<50% 的样本作为 AAV8 阴性样本，并通过重复筛选试验和确证试验分别确定 MCP=1.08、CCP=29.5%。同时考察了该方法的方法灵敏度、药物耐受性、精密度、选择性、稳定性。方法灵敏度结果显示，该方法的筛选灵敏度为 43.1 ng/mL，确证灵敏度为 76.5 ng/mL，方法灵敏度较高，且在 1 250 ～ 5 000 ng/mL 不存在影响检测结果的钩状效应。药物耐受性结果显示，1 000 ng/mL 的阳性抗体可耐受 1.25×10^{10} GC/mL 的 AAV8，100 ng/mL 的阳性抗体可耐受 3.13×10^{9} GC/mL 的 AAV8，50 ng/mL 的阳性抗体可耐受 1.56×10^{9} GC/mL 的 AAV8。若使用该方法检测给药后抗 AAV8 衣壳 TAb，当给药剂



A—抗 AAV8 衣壳 TAb 检测；B—抗 AAV2 衣壳 TAb 检测；C—抗 AAV5 衣壳 TAb 检测；D—抗 AAV9 衣壳 TAb 检测。

图 10　样品测定结果

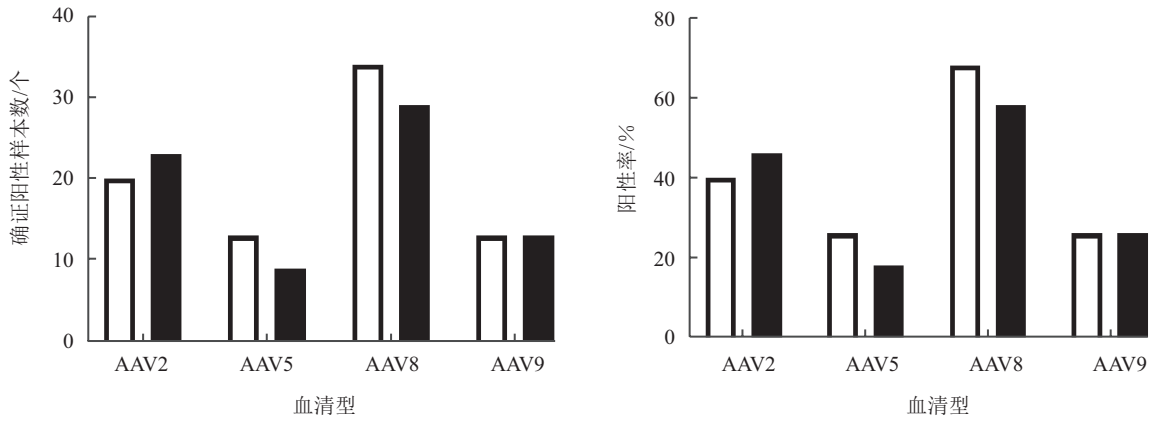
Fig.10　Results of Sample Testing

量较高，使所采集样本中的药物含量超过可耐受剂量时，将会干扰检测结果，导致假阴性，此时需要考虑检测前对样本进行酸解或通过其他方式消除药物对检测结果的影响。由于基于 AAV 的基因治疗产品通常为单一剂量，且给药后全身 AAV 浓度迅速下降[15]，因此认为该方法的药物耐受性可满足给药后抗 AAV8 衣壳 TAb 检测。精密度结果显示，样本信号值和 SIR 的批内及批间均满足 CV<20%的要求，即采用该方法所得结果的精密度较好。选择性试验结果表明，该方法能够检测出不少于 80%样本中抗 AAV8 衣壳 TAb，选择性较高。稳定性结果表明，血清样本中的抗 AAV8 衣壳 TAb 用酪蛋白封闭缓冲液稀释后室温放置不超过 2.5 h、室温或者 2 ～ 8 ℃放置不超过 25 h 以及冻融不超过 6 次均不影响筛选和确证试验的阴性或阳性判定，可满足检测需求。

本研究在使用该方法检测 50 个恒河猴血清样本中抗 AAV8 衣壳 TAb 的同时，为了考察该方法的适用性，还检测这些血清样本中抗 AAV2 衣壳、抗 AAV5 衣壳以及抗 AAV9 衣壳的 TAb。检测结果显示，AAV2、AAV5、AAV8、AAV9 的 TAb 筛选阳性率分别为 56%、34%、72%、56%，确证阳性率分别为 40%、26%、68%、26%，AAV2、AAV5、AAV8、AAV9 确证阳性样本中筛选试验也为阳性的样本占 95%、84.6%、94.1%、100%，筛选试验和确证试验的相关性较大；除 AAV9 外，其他血清型 AAV 筛选试验信号值与确证试验 SIR 呈正相关，表明本方法特异性较高，筛选试验信号值对于 AAV2、AAV5 和 AAV8 是有特异性的，而抗 AAV9 衣壳 TAb 检测试验中，样本信号值明显高于其他 AAV，且确证阳性仅占筛选阳性的 46.4%，表明使用该方法对 AAV9 的非特异性结合较强，实际检测时需对试验条件进行优化。总体来看，使用

类似于抗药抗体检测多层级分析法，先使用筛选试验筛选“疑似阳性”样本，再通过确证试验对“疑似阳性”样本进行确证，这对于抗 AAV 衣壳 TAb 分析是可行的。

目前，对于确证试验中是否需要计算 CCP 或是使用 SIR>50％作为阳性判定标准仍无定论。就本研究检测结果来看（如图 11 所示，图 11A 为阳性样本数，图 11B 为阳性率），以 CCP 为阈值或以 SIP 50％为阈值，对不同 AAV 血清型的判定结果影响不同：当 CCP>50％时（如 AAV5、AAV9），以 SIP 550％作为阈值更保守；当 CCP<50％时（如 AAV2、AAV8），以 CCP 作为阈值更保守。所以使用何种方式进行确证试验的阳性判定标准，需根据不同的研究目的和实际情况进行衡量，不能一概而论。



A—阳性样本数；B—阳性率。

□—SIR>CCP；■—SIR>50％。

图 11 确证阳性样本

Fig.11 The Positive Samples of Confirmatory Assay

参考文献：

[1] VERDERA H C, KURANDA K, MINGOZZI F. AAV vector immunogenicity in humans: a long journey to successful gene transfer [J]. *Mol Ther*, 2020, **28**(3): 723-746.

[2] PASI K J, RANGARAJAN S, MITCHELL N, *et al*. Multiyear follow-up of AAV5-hF Ⅷ -SQ gene therapy for hemophilia A [J]. *N Engl J Med*, 2020, **382**(1): 29-40.

[3] DAY J W, FINKEL R S, CHIRIBOGA C A, *et al*. Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STR1VE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial [J]. *Lancet Neurol*, 2021, **20**(4): 284-293.

[4] KUZMIN D A, SHUTOVA M V, JOHNSTON N R, *et al*. The clinical landscape for AAV gene therapies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, **20**(3): 173-174.

[5] SIMMONS E, WEN Y, LI J, *et al*. A sensitive and drug tolerant assay for detecting anti-AAV9 antibodies using affinity capture elution [J]. *J Immunol Methods*, 2023, **512**: 113397.

[6] NIDETZ N F, MCGEE M C, TSE L V, *et al*. Adeno-associated viral vector-mediated immune responses: understanding barriers to gene delivery [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, **207**: 107453.

[7] MUHURI M, MAEDA Y, MA H, *et al*. Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors [J]. *J Clin Invest*, 2021, **131**(1): 1-14.

[8] MAJOWICZ A, NIJMEIJER B, LAMPEN M H, *et al*. Therapeutic hFIX activity achieved after single AAV5-hFIX treatment in hemophilia B patients and NHPs with preexisting anti-AAV5 NABs [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, **14**: 27-36.

[9] GEORGE L A, RAGNI M V, RASKO J E J, *et al*. Long-term follow-up of the first in human intravascular delivery of AAV for gene transfer: AAV2-hFIX16 for severe hemophilia B [J].

（下转第 865 页）

点工作 [EB/OL]. (2020-12-21) [2024-04-06]. https://www.cfdi.org.cn/resource/news/12900.html.

[10] 浙江省药品监督管理局. 省药品检查中心开发数字化应用探索开展非现场检查新模式 [EB/OL]. (2022-05-11) [2024-04-06]. http://mpa.zj.gov.cn/art/2022/5/11/art_1228989351_58928771.html.

[11] 浙江省药品监督管理局. 绍兴市局探索药品生产远程“非现场”检查 [EB/OL]. (2022-06-28) [2024-04-06]. http://mpa.zj.gov.cn/art/2022/6/28/art_1228989352_58929264.html.

[12] 浙江省药品监督管理局.“浙苗链”“黑匣子”正式上线 [EB/OL]. (2021-04-15) [2024-04-06]. http://mpa.zj.gov.cn/art/2021/4/15/art_1228989351_58925155.html.

[13] 江苏省药品监督管理局. 省药监局召开药品智慧监管综合平台一期项目启动会 [EB/OL]. (2023-11-27) [2024-04-06]. http://da.jiangsu.gov.cn/art/2023/11/27/art_84602_11081921.html.

[14] 张薇薇, 范青峰. “远程+现场”检查模式及监管策略 [J]. 化工管理, 2023, (34): 102-105.

[15] 海南省药品监督管理局. 海南创新检查模式提升服务效能 —— 省药品查验中心开展“远程+现场”检查 [EB/OL]. (2023-06-05) [2024-04-06]. https://amr.hainan.gov.cn/himpa/ztzl/lqlcxd/202306/t20230619_3437982.html.

[16] 朱 明, 常丽梅, 符 祝, 等. 移动互联网技术用于药品注册现场检查实践与效果 [J]. 中国药业, 2019, **28**(22): 68-70.

[17] 河南省药品监督管理局. 省药监局召开药品远程监管“千里眼工程”工作推进会 [EB/OL]. (2022-11-07) [2024-04-06]. https://yjj.henan.gov.cn/2022/11-15/2639336.html.

[18] 霍凤兰. 稳步推进药品生产非现场监管信息系统试点建设 [J]. 中国食品药品监管, 2011, (8): 30-31.

[19] 王鼎峰, 林 红, 陈 航, 等. 药品远程非现场检查开展模式研究 [J]. 海峡药学, 2023, **35**(9): 108-110.

[20] 国家药品监督管理局. 国家药品监督管理局成为药品检查合作计划正式申请者 [EB/OL]. (2023-11-09) [2022-04-06]. https://www.nmpa.gov.cn/yaowen/ypjgyw/ypyw/20231109101918137.html.

(上接第 859 页)

Mol Ther, 2020, **28**(9): 2073-2082.

[10] NASO M F, TOMKOWICZ B, PERRY W L, *et al*. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy [J]. *Bio Drugs*, 2017, **31**(4): 317-334.

[11] BAATARTSOGT N, KASHIWAKURA Y, HAYAKAWA M, *et al*. A sensitive and reproducible cell-based assay via secNanoLuc to detect neutralizing antibody against adeno-associated virus vector capsid [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, **22**: 162-171.

[12] BERTIN B, VERON P, LEBORGNE C, *et al*. Capsid-specific removal of circulating antibodies to adeno-associated virus vectors [J]. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 864.

[13] KASPRZYK T, TRIFFAULT S, LONG B R, *et al*. Confirmatory detection of neutralizing antibodies to AAV gene therapy using a cell-based transduction inhibition assay [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2022, **24**: 222-229.

[14] KRUZIK 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.

[15] GOROVITS B, AZADEH M, BUCHLIS G, *et al*. Evaluation of the humoral response to adeno-associated virus-based gene therapy modalities using total antibody assays [J]. *AAPS*, 2021, **23**(6): 108.