

• 技术方法 •

大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)中宿主残留 DNA 片段大小分析方法的建立、验证及应用

邱冉^{1,2,3}, 张青梅^{1,2,3}, 乐洋^{1,2,3}, 纪德铭⁴, 吴东萍^{1,2,3}, 张晓宇^{1,2,3}, 李芳^{1,2,3},
吴文逸^{1,2,3}, 袁小铃⁵, 张琪梦⁵, 刘博^{1,2,3}, 张哲罡^{1,2,3}

1. 武汉生物制品研究有限责任公司病毒性疫苗研究二室, 湖北 武汉 430207; 2. 国家联合疫苗工程技术研究中心, 湖北 武汉 430207; 3. 新发传染病新型疫苗研发全国重点实验室, 湖北 武汉 430207; 4. 国药集团武汉生物制药有限公司科研开发部, 湖北 武汉 430207; 5. 湖州申科生物技术股份有限公司, 浙江 湖州 313000

摘要: **目的** 建立一种基于磁珠法及实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 的 MDCK 细胞宿主残留 DNA (host cell residual DNA, HCD) 片段大小的分析方法, 并进行验证, 以期用于评估大流行流感全病毒灭活疫苗 (H5N1) 生产过程中 HCD 的清除效果。 **方法** 采用磁珠法提取样品 HCD, 通过设计特异性引物与探针, 建立可分别定量 84、142、204 及 504 bp DNA 片段的 qPCR 分析方法。验证方法的线性范围、定量限、精密性、准确性、耐用性及专属性。采用建立的方法分析大流行流感全病毒灭活疫苗 (H5N1) 过程样品 HCD 片段占比, 并检测 HCD 含量。 **结果** 84、142、204、504 bp 标准品在 0.003 ~ 300 pg / μ L 范围内, 与 C_t 值呈良好的线性关系, 且 4 条标准曲线决定系数 (R^2) 均 > 0.99; 84、142、204 bp 定量限均为 3 fg / μ L, 504 bp 的定量限为 1 fg / μ L; 84、142、204、504 bp 对应的高、中、低浓度加标样品回收率均在 50% ~ 150% 范围内; 精密性、耐用性、专属性验证 CV 均 $\leq$ 40%。大流行流感全病毒灭活疫苗 (H5N1) 收获液中大片段 HCD 占比较高 ($\geq$ 204 bp 片段占比 81.0%), 经过酶解和纯化工序, 原液中 $\geq$ 204 bp 片段占比降至 8.9%, 且未检出 $\geq$ 504 bp 片段, 同时 HCD 总含量由 689.9 ng / mL 降至 10.2 ng / mL。 **结论** 建立了 HCD 片段大小的 qPCR 分析方法, 该方法具有良好的精密性、准确性、耐用性和专属性, 可用于大流行流感全病毒灭活疫苗 (H5N1) HCD 片段的分析及生产过程的质量控制。

关键词: 大流行流感全病毒灭活疫苗 (H5N1); MDCK 细胞; 宿主残留 DNA 片段; 实时荧光定量 PCR; 磁珠法

中图分类号: R392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2025)12-1451-07

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.004623

Development, verification and application of an assay for the size of host cell residual DNA fragments in pandemic influenza vaccine (H5N1)

QIU Ran*, ZHANG Qingmei, LE Yang, JI Deming, WU Dongping, ZHANG Xiaoyu, LI Fang,
WU Wenyi, YUAN Xiaoling, ZHANG Qimeng, LIU Bo, ZHANG Zhegang

*Viral Vaccine Research and Development 2 Unit, Wuhan Institute of Biological
Products Co., Ltd., Wuhan 430207, Hubei Province, China

Corresponding author: ZHANG Zhegang, E-mail: zhangzhegang@sinopharm.com

Abstract: **Objective** To develop and verify an analytical method for the size of host cell residual DNA (HCD) fragments in MDCK cells based on magnetic bead method and quantitative real-time PCR (qPCR), so as to use it to evaluate the removal effect of HCD during the production process of pandemic influenza vaccine (H5N1). **Methods** The HCD of samples was extracted by magnetic bead method, and specific primers and probes were designed to establish qPCR analytical method that can quantify 84, 142, 204 and 504 bp DNA fragments, respectively. The established method was verified for the linear range, limit of quantitation (LOQ), precision, accuracy, robustness and specificity, and used to analyze the proportion of HCD fragments in the process samples of pandemic influenza vaccine (H5N1), and the HCD content was simultaneously detected. **Results** The linear ranges of 84, 142, 204 and 504 bp standards were 0.003 - 300 pg/ μ L, showing a good linear relationship with C_t ,

基金项目: 载体介导创新药物关键技术研发(2022023702025187)。

通信作者: 张哲罡, E-mail: zhangzhegang@sinopharm.com

and the coefficients of determination (R^2) of the four standard curves were all greater than 0.99. The LOQs of 84, 142 and 204 bp were 3 fg/ μ L, and the LOQ of 504 bp was 1 fg/ μ L. The recovery rates of spiked samples at high, medium and low concentrations corresponding to 84, 142, 204 and 504 bp were all within the range of 50% to 150%. The CVs of precision, robustness and specificity verification were not greater than 40%. The proportion of large HCD fragments in the harvest solution of pandemic influenza vaccine (H5N1) was relatively high (≥ 204 bp fragments accounted for 81.0%). After enzymatic hydrolysis and purification, the proportion of ≥ 204 bp fragments in the bulk solution was reduced to 8.9%, and no ≥ 504 bp fragments were detected. At the same time, the total HCD content was reduced from 689.9 ng/mL to 10.2 ng/mL. **Conclusion** The qPCR analytical method for HCD fragment size was developed with good precision, accuracy, robustness and specificity, which can be used for the analysis and detection of HCD fragments of pandemic influenza vaccine (H5N1) and the quality control in the production process.

Keywords: Pandemic influenza vaccine (H5N1); MDCK cells; Host cell residual DNA (HCD) fragment; Quantitative real-time PCR (qPCR); Magnetic bead method

大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)是将世界卫生组织(World Health Organization, WHO)推荐的大流行流感病毒株接种至MDCK细胞后,经培养、收获、灭活及纯化等步骤制备而成。MDCK细胞是犬肾上皮连续细胞系^[1],对流感病毒株具有高易感性^[2-5]。2007年,首个采用MDCK细胞生产的三价流感亚单位疫苗(商品名:OPTAFU,生产厂家:瑞士诺华制药有限公司)获批上市^[6-7]。MDCK细胞作为传代细胞系用于疫苗生产,具有潜在的成瘤性、致癌性,相关疫苗的安全性备受关注^[8-9]。

生物制品中的宿主细胞残留DNA(host cell residual DNA, HCD)可能携带源于宿主细胞的致癌基因或其他病毒相关基因,引发肿瘤或感染等情况,可通过去除HCD的生物活性以降低此类风险。HCD生物活性的去除主要通过降低HCD的含量或减小HCD片段大小来实现,因此,细胞基质疫苗产品的HCD片段大小是与产品安全性相关的关键指标^[10-12]。本研究旨在建立基于磁珠法及实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)的MDCK细胞HCD片段大小分析方法,并进行验证,以期用于检测大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)的HCD片段大小,确保疫苗安全性。

1 材料与方法

1.1 样品 大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)收获液(批号:2023005H5V)、酶解液(批号:2023005H5E)、纯化液(批号:2023005H5C)、原液(批号:2023005H5)均由武汉生物制品研究所有限责任公司病毒性疫苗研究二室制备并提供。

1.2 主要试剂及仪器 无水乙醇、异丙醇及氯化钠均购自国药集团化学试剂有限公司;核酸酶购自上

海雅心生物技术有限公司;HCD样本前处理试剂盒(磁珠法)、MDCK残留DNA片段分析检测试剂盒、MDCK残留DNA含量检测试剂盒及rDNA purify HCD前处理系统均购自湖州申科生物技术有限公司;荧光定量96孔PCR板及ABI 7500荧光定量PCR仪购自美国Thermo公司。

1.3 HCD的提取 用HCD样本前处理试剂盒中的稀释液将待测样品进行100倍稀释,以稀释液作为阴性质控(NCS),将待测样品及NCS均采用该试剂盒进行前处理,放入rDNA purify HCD前处理系统提取HCD。为满足后续同步扩增不同长度DNA片段的要求,DNA洗脱液体积需 $\geq 120 \mu$ L。

1.4 方法的建立 用MDCK残留DNA片段分析检测试剂盒中的稀释液分别将该试剂盒中的84、142、204、504 bp DNA定量参考品稀释至300、30、3、0.3、0.03、0.003 pg/ μ L(标准品)。根据说明书分别配制84、142、204、504 bp对应的qPCR反应体系,加入荧光定量96孔PCR板中,20 μ L/孔;再向对应孔中加入相应浓度标准品、待测样品、NCS及阴性对照(稀释液),10 μ L/孔,总反应体积为30 μ L/孔。将荧光定量96孔PCR板放入ABI 7500荧光定量PCR仪,在ABI 7500 SDS软件中创建新检测探针,分别命名为MDCK-84、MDCK-142、MDCK-204、MDCK-504,选择报告荧光基因为FAM,猝灭荧光基因为none;创建内参检测探针,命名为IPC,选择报告荧光基因为VIC,猝灭荧光基因为none;检测参比荧光为ROX。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性10 min;95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸90 s(读取荧光),共40个循环。

1.5 数据分析 在ABI 7500 SDS软件中将阈值设为0.02,选择自动设置基线,将各片段对应标准曲线孔分别赋值为300、30、3、0.3、0.03、0.003,标准曲线决定系数(R^2)应 ≥ 0.99 ,待测样品的 C_t -IPC均值与NCS

的 C_t -IPC 均值应在 ± 1 个 C_t 值范围内;阴性对照的检测结果应为 Undetermined(未检出)或 $C_t \geq 35.00$, VIC 信号应为有效的“S”型扩增曲线;NCS FAM 信号的 C_t 均值 $>$ 标准曲线最低浓度 FAM 信号 C_t 均值或扩增曲线无明显起峰, VIC 信号应为有效的“S”型扩增曲线。以待测样品 84 bp 片段的 DNA 浓度为 100%, 计算 142、204、504 bp 片段的占比。

1.6 方法的验证

1.6.1 线性范围 将 84、142、204、504 bp MDCK DNA 定量参考品用 HCD 样本前处理试剂盒中的稀释液稀释为 300~0.003 pg/ μ L, 采用建立的方法进行检测, 每个浓度设 3 个复孔, 以参考品浓度为横坐标, C_t 值为纵坐标, 获得标准曲线方程, 并计算决定系数(R^2)。

1.6.2 定量限 将 84、142、204、504 bp MDCK DNA 定量参考品用 HCD 样本前处理试剂盒中的稀释液分别稀释至 3、1、0.3 fg/ μ L, 采用建立的方法进行检测, 每个浓度设 3 个复孔, 计算复孔间 C_t 变异系数(coefficient of variation, CV)及回收率(实测值/预期值 $\times 100\%$)。

1.6.3 精密性

1.6.3.1 重复性 取大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)原液, 用 HCD 样本前处理试剂盒中的稀释液进行 100 倍稀释, 经前处理后, 由同一实验员采用建立的方法检测 HCD 片段大小, 试验重复 3 次, 计算 CV。

1.6.3.2 中间精密性 取 1.6.3.1 项中的样品, 由 2 名实验员于不同时间点重复检测 3 次, 计算 6 次检测结果的 CV。

1.6.4 准确性 取大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)原液, 用 HCD 样本前处理试剂盒中的稀释液进行 100 倍稀释, 分别加入 10 μ L 300 pg/ μ L(高)、10 μ L 30 pg/ μ L(中)、30 μ L 3 pg/ μ L(低)3 个浓度的相应片段大小标准品, 获得加标样品, 经前处理后采用建立的方法检测 HCD 片段大小, 以重复性验证中 3 次重复检测的平均值为未加标检测值, 按下式计算加标回收率。

加标回收率(%) = (加标样检测值 - 未加标检测值) $\times$ 前处理洗脱体积 / (加标体积 $\times$ 加标浓度) $\times 100\%$

1.6.5 耐用性 取大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)原液, 用 HCD 样本前处理试剂盒中的稀释液进行 100 倍稀释, 分别在 50、55、60 $^{\circ}$ C 条件下进行前处理, 采用建立的方法检测 HCD 片段大小, 计算 CV。

1.6.6 专属性 将大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)原液分别用 HCD 样本前处理试剂盒中的稀释液(稀释液 1)和添加核酸酶(0.4 ng/mL)的 PBS 溶液(稀释液 2)进行 100 倍稀释, 经前处理后采用建立的方

法检测 HCD 片段大小, 计算 CV。

1.7 方法的应用 采用建立的方法对大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)生产过程样品(收获液、酶解液、纯化液、原液)HCD 片段大小进行检测, 并采用 MDCK 残留 DNA 含量检测试剂盒检测 HCD 含量。

1.8 数据采集及分析 应用 ABI 7500 SDS v1.4 软件进行数据采集及分析。

2 结果

2.1 方法的验证

2.1.1 线性范围 84、142、204、504 bp DNA 定量参考品浓度在 300~0.003 pg/ μ L 范围内, 与 C_t 值均呈良好的线性关系, 标准曲线方程分别为 $Y = -3.4512X + 23.7512$ 、 $Y = -3.4512X + 23.7512$ 、 $Y = -3.5460X + 24.9629$ 、 $Y = -3.4764X + 23.1199$, R^2 分别为 0.9993、0.9998、0.9993、0.9993, 均 ≥ 0.99 , 见表 1。

表 1 线性范围验证结果(C_t 均值, $n = 3$)

Tab. 1 Verification for linear ranges (means of C_t , $n = 3$)

DNA 定量参考品 浓度(pg/ μ L)	84 bp	142 bp	204 bp	504 bp
300	14.911 9	15.128 0	14.438 6	16.014 4
30	18.577 7	18.746 4	17.965 5	19.765 3
3	21.960 7	22.163 3	21.556 3	23.443 5
0.3	25.375 5	25.497 3	24.967 6	26.890 2
0.03	28.813 4	28.945 8	28.491 9	30.360 2
0.003	32.089 7	32.521 2	31.775 9	33.790 4

2.1.2 定量限 84、142、204 bp DNA 定量参考品浓度为 3 fg/ μ L, 504 bp DNA 定量参考品浓度为 1 fg/ μ L 时, 回收率为 83.3%~117.8%, 均在 80%~120% 范围内; CV 为 3.1%~24.2%, 均 $\leq 40\%$ 。见表 2。表明该检测方法针对 84、142、204 bp 定量限为 3 fg/ μ L, 504 bp 的定量限为 1 fg/ μ L。

2.1.3 精密性

2.1.3.1 重复性 同一实验员重复 3 次检测大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)原液中 84、142、204 bp DNA 浓度及占比的 CV 均 $\leq 40\%$, 见表 3(504 bp DNA 浓度低于标准曲线线性范围下限, 故略)。表明该检测方法针对 84、142、204 bp DNA 的重复性良好。

2.1.3.2 中间精密性 不同实验员重复 6 次检测大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)原液 84、142、204 bp DNA 浓度及占比的 CV 均 $\leq 40\%$, 见表 4(504 bp DNA 浓度低于标准曲线线性范围下限, 故略)。表明该检测方法针对 84、142、204 bp DNA 的中间精密性良好。

表 2 定量限验证结果(%)

Tab. 2 Verification for limits of quantification (%)

DNA 浓度(ng / μL)	84 bp		142 bp		204 bp		504 bp	
	CV	回收率	CV	回收率	CV	回收率	CV	回收率
3	24. 2	117. 8	3. 1	93. 0	12. 3	117. 7	14. 4	118. 2
1	118. 7	321. 9	106. 7	57. 8	16. 6	129. 9	7. 2	83. 3
0. 3	55. 4	332. 8	137. 1	718. 5	137. 6	4 196. 1	5. 6	236. 4

表 3 重复性验证结果

Tab. 3 Verification for repeatability

重复次数	84 bp		142 bp		204 bp	
	DNA 浓度(× 10 pg / μL)	占比(%)	DNA 浓度(× 10 ² pg / μL)	占比(%)	DNA 浓度(× 10 ² pg / μL)	占比(%)
1	1. 710	100	4. 199	24. 6	1. 878	11. 0
2	1. 644	100	4. 908	29. 9	1. 768	10. 8
3	1. 713	100	5. 107	29. 8	1. 936	11. 3
CV(%)	2. 3	0	10. 1	10. 9	4. 6	2. 5

表 4 中间精密性验证结果

Tab. 4 Verification for intermediate precision

实验员	检测次数	84 bp		142 bp		204 bp	
		DNA 浓度(× 10 pg / μL)	占比(%)	DNA 浓度(× 10 ² pg / μL)	占比(%)	DNA 浓度(× 10 ² pg / μL)	占比(%)
1	1	1. 710	100	4. 199	24. 6	1. 878	11. 0
	2	1. 644	100	4. 908	29. 9	1. 768	10. 8
	3	1. 713	100	5. 107	29. 8	1. 936	11. 3
2	1	1. 607	100	4. 937	30. 7	1. 873	11. 7
	2	1. 578	100	4. 718	29. 9	1. 820	11. 5
	3	1. 583	100	4. 823	30. 5	1. 845	11. 7
CV(%)		3. 7	0	6. 6	7. 9	3. 1	3. 3

2. 1. 4 准确性 84、142、204、504 bp 对应的高、中、低浓度加标样品回收率为 63. 1%~73. 2%, 均在 50%~150% 范围内(504 bp DNA 浓度低于标准曲线线性范围下限, 以 0 pg / μL 作为 504 bp 片段的未加标浓度), 见表 5。表明该方法具有良好的准确性。

表 5 准确性验证结果(回收率, %)

Tab. 5 Verification for accuracy (recovery rates, %)

加标量	84 bp	142 bp	204 bp	504 bp
高	73. 2	71. 2	68. 0	72. 8
中	70. 9	67. 4	66. 7	66. 2
低	63. 1	68. 6	71. 2	69. 8

2. 1. 5 耐用性 前处理中孵育温度为 50、55、60 °C 时, 各片段 DNA 浓度及占比 CV 均 ≤ 40%, 见表 6[由于大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)原液中 504 bp

DNA 浓度低于标准曲线线性范围下限, 故略)。表明该方法具有良好的耐受性。

2. 1. 6 专属性 用稀释液 1 和 2 稀释原液中各片段 DNA 浓度及占比 CV 均 ≤ 40%, 见表 7[由于大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)原液中 504 bp DNA 浓度低于标准曲线线性范围下限, 故略)。表明疫苗生产过程中用到缓冲液和核酸酶对检测方法无影响。

2. 2 方法的应用 大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)生产过程中的收获液含有较高比例的大片段 HCD, ≥ 204 bp 片段占比达 81. 0%, ≥ 504 bp 片段占比达 23. 9%; 经酶解及纯化, 大片段 HCD 占比逐渐降低, 原液中 ≥ 204 bp 片段占比仅剩 8. 9%, 未检出 ≥ 504 bp 片段。同时, 样品的 HCD 浓度也逐渐降低, 由 689. 9 ng / mL 降至 10. 2 ng / mL。见表 8。表明疫苗的生产工艺可有效去除 HCD 生物活性。

表 6 耐用性验证结果

Tab. 6 Verification for robustness

孵育温度(℃)	84 bp		142 bp		204 bp	
	DNA 浓度($\times 10$ pg / μ L)	占比(%)	DNA 浓度($\times 10^2$ pg / μ L)	占比(%)	DNA 浓度($\times 10^2$ pg / μ L)	占比(%)
50	1. 239	100	2. 833	22. 9	1. 213	9. 8
55	1. 218	100	2. 770	22. 7	1. 143	9. 4
60	1. 216	100	2. 895	23. 8	1. 119	9. 2
CV(%)	1. 0	0	2. 2	2. 5	4. 2	3. 2

表 7 专属性验证结果

Tab. 7 Verification for specificity

稀释液	84 bp		142 bp		204 bp	
	DNA 浓度($\times 10$ pg / μ L)	占比(%)	DNA 浓度($\times 10^2$ pg / μ L)	占比(%)	DNA 浓度($\times 10^2$ pg / μ L)	占比(%)
1	1. 218	100	2. 770	22. 7	1. 143	9. 4
2	1. 252	100	3. 149	25. 2	1. 138	9. 1
CV(%)	1. 9	0	9. 1	7. 1	0. 3	2. 3

表 8 大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)生产过程样品中HCD检测结果

Tab. 8 Results of HCD in production process samples of pandemic influenza vaccine (H5N1)

样品名称	片段占比(%)				HCD 含量(ng / mL)
	≥ 84 bp	≥ 124 bp	≥ 204 bp	≥ 504 bp	
收获液	100. 0	81. 0	53. 0	23. 9	689. 9
酶解液	100. 0	53. 7	35. 6	15. 4	88. 4
纯化液	100. 0	28. 5	13. 9	0. 2	12. 3
原液	100. 0	23. 4	8. 9	0	10. 2

3 讨论

2020 年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)指导文件中要求,基因治疗类药物的 HCD 需控制在低于 10 ng / 剂,且 DNA 片段 < 200 bp^[13-14]。2022 年,中国国家药品监督管理局药品审评中心发布的指导原则规定,若生产中采用肿瘤细胞系、致瘤细胞系或携带有致瘤基因、病毒来源序列的细胞,在确保无完整活细胞残留的同时,应尽量将 HCD 控制在 10 ng / 剂以内, DNA 残留片段的大小控制在 200 bp 以下^[15]。这些文件为生物制品生产过程中 HCD 的控制提供了明确的标准和要求。基于目前的证据,最小的功能基因大小约为 200 bp,因此降低 HCD 片段大小可降低所使用的细胞系潜在的致瘤性和感染性风险,对于保障药品的安全性和质量具有重要意义^[16-17]。

近年,发展出了多种 HCD 片段分析技术,包括毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)、数字 PCR(digital PCR, dPCR)及 qPCR 法等。CE 法以毛细管为分离通道,以高压直流电场为驱动力,基于被分析物分子量的差异,在凝胶体系中实现高分辨率分离^[18]。

WANG 等^[10]建立了毛细管凝胶电泳-激光诱导荧光检测(capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, CGE-LIF)法,可准确分析慢病毒 50 ~ 1 000 bp 的 HCD 片段分布。闫璐瑶等^[19]建立了基于微型化芯片毛细管电泳法,可对 35 ~ 10 380 bp 范围的 HCD 片段进行检测。dPCR 凭借微滴分割与绝对定量优势,无需标准曲线即可实现高灵敏度检测,且无需进行 DNA 提取步骤,检测方法快速简便^[20-22]。qPCR 技术则可通过设计多套引物,准确量化不同长度 HCD 片段的比例。本研究基于 qPCR 法分析流感疫苗中的 HCD 片段浓度,该方法灵敏度高,能够检测到微量 HCD,且定量准确,可精确计算出 HCD 不同片段的比例;qPCR 法特异性好,通过设计特异性引物和探针,可针对特定宿主细胞的 DNA 进行检测,避免其他非目标 DNA 的干扰,且检测速度相对较快,仅需数小时,适合高通量检测^[23-25]。本研究对该方法检测大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)进行了验证,验证结果表明,该方法具有良好的线性、精密性、准确性、耐用性及专属性,且该方法使用的试剂盒的性能验证中已进行了针对其他细胞的专属性验证,结果表明,该试剂盒无法检出其他种属细胞

DNA。以上结果表明,该方法可对大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)的HCD片段占比进行准确分析。应用该方法检测大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)的生产过程样品,结果表明,随着疫苗生产过程中的酶解和纯化处理,大片段HCD占比逐步降低,与样品中HCD含量变化趋势相符。

大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)是国内第一款获得临床批件的以MDCK细胞为基质的大流行流感疫苗,因此,需建立针对MDCK细胞相关残留的质控方法。大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)原液HCD含量为10.2 ng/mL,换算为每剂次HCD含量仅为340 pg/剂,远低于监管部门的规定,且HCD中>504 bp片段已被完全去除,>204 bp片段占比为8.9%,表明在该产品的生产及纯化过程中,HCD生物活性已降至极低水平,保障了产品的安全性。

综上所述,本研究成功建立并验证了检测大流行流感全病毒灭活疫苗(H5N1)中HCD片段占比的方法,为准确评估疫苗中HCD残留情况提供了可靠手段。后续可进一步探索该方法在不同细胞系为基质的生物制品HCD检测领域的应用,还可寻求与其他先进检测技术的联用,进一步提升对HCD残留检测的全面性与精准度。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参考文献

- [1] RODRIGUES A F, FERNANDES P, LASKE T. Cell Bank Origin of MDCK Parental Cells Shapes Adaptation to Serum-Free Suspension Culture and Canine Adenoviral Vector Production [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (17): 6111.
- [2] HARADA Y, TAKAHASHI H, FUJIMOTO T. Evaluation of a qualified MDCK cell line for virus isolation to develop cell-based influenza vaccine viruses with appropriate antigenicity [J]. *Vaccine*, 2024, 42 (23): 126242. DOI: 10.1016/j.vaccine.2024.126242.
- [3] SUDERMAN M, MONIWA M, ALKIE T N. Comparative Susceptibility of Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Derived Cell Lines for Isolation of Swine Origin Influenza A Viruses from Different Clinical Specimens [J]. *Viruses*, 2021, 13 (12): 2346.
- [4] HAMAMOTO I, TAKAHASHI H, SHIMASAKI N. Suitability of NIID-MDCK cells as a substrate for cell-based influenza vaccine development from the perspective of adventitious virus susceptibility [J]. *Microbiol Immunol*, 2022, 66 (7): 361-370.
- [5] YANG Z, YU S, XU Y. The Screening and Mechanism of Influenza-Virus Sensitive MDCK Cell Lines for Influenza Vaccine Production [J]. *Diseases*, 2024, 12 (1): 20.
- [6] DOROSHENKO A, HALPERIN S A. Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine Optaflu (Novartis Vaccines) [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8 (6): 679-688.
- [7] GREGERSEN J P, SCHMITT H J, TRUSHEIM H. Safety of MDCK cell culture-based influenza vaccines [J]. *Future Microbiol*, 2011, 6 (2): 143-152.
- [8] YANG D, HUANG L, WANG J. Tumorigenesis mechanism and application strategy of the MDCK cell line: A systematic review [J]. *Biologicals*, 2023, 83: 101699. DOI: 10.1016/j.biologicals.2023.101699.
- [9] MA G L, QIAO Z L, HE D. Establishment of a low-tumorigenic MDCK cell line and study of differential molecular networks [J]. *Biologicals*, 2020, 68: 112-121.
- [10] WANG W, GAO T, LUO J. Size distribution analysis of residual host cell DNA fragments in lentivirus by CGE-LIF [J]. *Electrophoresis*, 2023, 44 (3-4): 462-471.
- [11] LIU F. Safety assessment of drug impurities for patient safety: A comprehensive review [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2024, 153: 105715. DOI: 10.1016/j.yrtph.2024.105715.
- [12] LI J, PAN R, YUE F. Evaluation of the Efficacy of the Vaccine Production Process in Removing Residual Host Cell DNA from the Vero Cell Rabies Vaccine [J]. *Vaccines (Basel)*, 2024, 12 (12): 1379.
- [13] U.S. Food and Drug Administration. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) [S]. 2020-01.
- [14] U.S. Food and Drug Administration. Characterization and qualification of cell substrates and other biological materials used in the production of viral vaccines for infectious disease indications [S]. 2010-02.
- [15] 国家药品监督管理局药品审评中心. 体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则(试行) [S]. 2022-05-31.
- [16] SHENG - FOWLER L, LEWIS A M, PEDEN K. Quantitative determination of the infectivity of the proviral DNA of a retrovirus in vitro: Evaluation of methods for DNA inactivation [J]. *Biologicals*, 2009, 37 (4): 259-269.
- [17] YANG H. Establishing acceptable limits of residual DNA [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2013, 67 (2): 155-163.
- [18] GEURINK L, VAN TRICHT E, VAN DER BURG D. Sixteen capillary electrophoresis applications for viral vaccine analysis [J]. *Electrophoresis*, 2022, 43 (9-10): 1068-1090.
- [19] YAN L Y, ZHANG J Y, ZHANG Q M, et al. Development and validation of a method for detection of size distribution of residual host cell DNA fragments [J]. *Chin J Biologicals*, 2021, 34 (3): 335-339, 348. (in Chinese)
闫璐瑶, 张家友, 张青梅, 等. 宿主细胞残留DNA片段大小分布检测方法的建立及验证 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34 (3): 335-339, 348.
- [20] HUSSAIN M. Isothermal droplet digital PCR method for quantification of CHO residual DNA [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 211: 114564. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114564.
- [21] HIGASHIYAMA K, YUAN Y, HASHIBA N. Quantitation of Residual Host Cell DNA in Recombinant Adeno-Associated Virus Using Droplet Digital Polymerase Chain Reaction [J]. *Hum Gene Ther*, 2023, 34 (11-12): 578-585.

(下转第1468页)

- conjugate vaccines, stratified by mixed priming schedules: PRE-VIX-COMBO and PREVIX-BOOST randomised controlled trials [J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22 (9): 1374-1387.
- [12] CANNON K, ELDER C, YOUNG M, et al. A trial to evaluate the safety and immunogenicity of a 20-valent pneumococcal conjugate vaccine in populations of adults ≥ 65 years of age with different prior pneumococcal vaccination [J]. *Vaccine*, 2021, 39 (51): 7494-7502.
- [13] KELLY S D, CLARKE B R, OVCHINNIKOVA O G, et al. Klebsiella pneumoniae O1 and O2ac antigens provide prototypes for an unusual strategy for polysaccharide antigen diversification [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294 (28): 10863-10876.
- [14] VILLENA R, KRIZ P, TIN TIN HTAR M, et al. Real-world impact and effectiveness of MenACWY-TT [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2023, 19 (2): 2251825. DOI: 10.1080/21645515.2023.2251825.
- [15] KHATUNTSEVA E A, NIFANTIEV N E. Cross reacting material (CRM197) as a carrier protein for carbohydrate conjugate vaccines targeted at bacterial and fungal pathogens [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 218: 775-798.
- [16] ZHEN L, CHEN W, ROSS R, et al. Effects of detoxification process on toxicity and foreign protein of tetanus toxoid and diphtheria toxoid [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2022, 1207: 123377. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123377.
- [17] VAN DER OUT R M F, METZ B, PIETERS R J. Carriers and antigens: New developments in glycoconjugate vaccines [J]. *Vaccines (Basel)*, 2023, 11 (2): 219.
- [18] ZHAO J, HU G, HUANG Y, et al. Polysaccharide conjugate vaccine: A kind of vaccine with great development potential [J]. *Chin Chem Lett*, 2021, 32 (4): 1331-1340.
- [19] CHEN Q, CHEN Z W, MA H L, et al. Screening and optimization of method for removing free polysaccharides from type 9V pneumococcal polysaccharide-protein conjugate [J]. *Chin J Biologicals*, 2024, 37 (5): 593-597. (in Chinese)
陈倩, 陈中伟, 马浩亮, 等. 9V 型肺炎球菌多糖蛋白结合物中游离多糖去除方法的筛选及优化 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2024, 37 (5): 593-597.
- [20] MA P, ZHENG Z, WANG D, et al. Development and validation of a HPSEC method for determination of free protein content in bulk of freeze-dried *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide conjugate vaccine [J]. *Prog Microbiol Immunol*, 2023, 51 (5): 39-46. (in Chinese)
马平, 郑喆, 王栋, 等. 高效分子排阻色谱法检测冻干 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗原液游离载体蛋白含量方法的建立与验证 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2023, 51 (5): 39-46.
- [21] BIEMANS R, MICOLI F, ROMANO M R. Glycoconjugate vaccines, production and characterization // RAUTER A P. *Recent Trends in Carbohydrate Chemistry* [M]. Amsterdam: Elsevier B.V., 2020: 285-313.
- [22] ZHANG F, THOMPSON C, MA N, et al. Carrier Proteins Facilitate the Generation of Antipolysaccharide Immunity via Multiple Mechanisms [J]. *mBio*, 2022, 13 (3): e0379021. DOI: 10.1128/mbio.03790-21.
- [23] Center for Disease Control and Prevention. ABCs Bact Facts Interactive Data Dashboard [EB/OL]. (2025-08-21) [2025-09-30]. <https://www.cdc.gov/abcs/bact-facts/data-dashboard.html>.
- [24] TERABE M, BERZOFKY J A. Tissue-Specific roles of NKT cells in tumor immunity [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1838.
- [25] KIRKWOOD J M, BUTTERFIELD L H, TARHINI A A, et al. Immunotherapy of cancer in 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62 (5): 309-335.
- [26] MELLMAN I, COUKOS G, DRANOFF G. Cancer immunotherapy comes of age [J]. *Nature*, 2011, 480 (7378): 480-489.
- [27] WU J, SU M, WANG W X. Research progress of NKT cells in tumor immunity [J]. *Anti-tumor Pharm*, 2018, 8 (4): 494-497, 511. (in Chinese)
吴静, 苏敏, 王文晓. NKT 细胞在肿瘤免疫中的研究进展 [J]. *肿瘤药学*, 2018, 8 (4): 494-497, 511.
- [28] DONG W, YUAN J, LI H, et al. Analysis of structure of degradation product of polysaccharide activator 1-cyano-4-dimethylamino-pyridinium [J]. *Chin J Biologicals*, 2021, 34 (2): 152-154, 160. (in Chinese)
董威, 袁军, 李红, 等. 多糖活化剂 1-氰基, 4-2 甲基氨基吡啶四氟硼酸盐降解产物的结构分析 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34 (2): 152-154, 160.
- [29] VAN DE BERG D, KIS Z, BEHMER C F, et al. Quality by design modelling to support rapid RNA vaccine production against emerging infectious diseases [J]. *NPJ Vaccines*, 2021, 6 (1): 65.

收稿日期: 2025-02-10 编辑: 何巍

(上接第 1456 页)

- [22] TIAN Y, WANG X, SHAO D. Establishment and evaluation of detection methods for process-specific residual host cell protein and residual host cell DNA in biological preparation [J]. *Cell Biochem Funct*, 2024, 42 (2): e3986. DOI: 10.1002/cbf.3986.
- [23] LI D, ZHANG Q, LIU G. Detection of residual E. coli host cell DNA by 23S ribosomal RNA gene-targeted quantitative polymerase chain reactions [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 198: 114000. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114000.
- [24] CORSARO B, YANG T Y, MURPHY R. 2020 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: Vaccine Assay Validation, qPCR Assay Validation, QC for CAR-T Flow Cytometry, NAb Assay Harmonization and ELISpot Validation (Part 3-Recommendations on Immunogenicity Assay Strategies, NAb Assays, Biosimilars and FDA/EMA Immunogenicity Guidance/Guideline) [J]. *Bioanalysis*, 2021, 13 (6): 415-463.
- [25] WANG G Y, SHI X C, YANG J Q, et al. Applied research on qPCR for determination of large fragment host cell residual DNA in recombinant adeno-associated virus products [J]. *Chin J Biologicals*, 2024, 37 (7): 775-778, 787. (in Chinese)
王光裕, 史新昌, 杨靖清, 等. qPCR 在重组腺相关病毒产品大片段宿主细胞残留 DNA 检测中的应用 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2024, 37 (7): 775-778, 787.

收稿日期: 2025-06-26 编辑: 李靓