

HL60-pNL3.2 报告基因热原检查法测定疫苗热原的适用性研究

王灿, 刘荔桢, 陈钢, 邵泓^{*} (上海市食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室, 上海 201203)

摘要: 目的 探讨 HL60-pNL3.2 报告基因热原检查法在水痘减毒活疫苗、流感病毒裂解疫苗、冻干甲型肝炎减毒活疫苗热原测定中的应用。方法 参照中国药典“体外热原检查法(报告基因法)”公示稿, 计算 3 种疫苗最大有效稀释倍数(maximum valid dilution, MVD), 干扰实验探讨 3 种疫苗对该方法测定热原是否存在干扰。参照中国药典 2020 年版通则 9101 对该方法测定 3 种疫苗热原进行方法学验证, 用经验证的方法测定 3 种疫苗热原含量。结果 水痘减毒活疫苗、流感病毒裂解疫苗、冻干甲型肝炎减毒活疫苗 MVD 分别为 1 000, 200 和 1 000 倍。在 MVD 范围内, 内毒素(endotoxin, LPS)在 3 种疫苗中的回收率在 52.5%~110.1%。方法学验证结果显示该方法可用于 3 种疫苗热原测定, LPS 浓度与其化学光强度(RLU 值)相关系数(R^2)均>0.98; LPS 浓度在 1~250 EU·mL⁻¹, 回收率结果在 76.4%~192.8%。LPS 浓度>5 EU·mL⁻¹时, 重复性变异度均<25%; 该方法用于 3 种疫苗热原测定的检测限和定量限在 0.05~0.13 EU·mL⁻¹。用建立的 HL60-pNL3.2 报告基因热原检查法测定 3 种疫苗热原含量, 均低于污染物限值。结论 HL60-pNL3.2 报告基因热原检查法具有不使用动物、操作简单、快速、检测热原谱广, 可对热原进行定量的优点, 可用于水痘减毒活疫苗、流感病毒裂解疫苗和冻干甲型肝炎减毒活疫苗热原测定。

关键词: 热原测定; 报告基因法; 水痘减毒活疫苗; 流感病毒裂解疫苗; 冻干甲型肝炎减毒活疫苗

中图分类号: R927.12 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)03-0354-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222350

引用本文: 王灿, 刘荔桢, 陈钢, 等. HL60-pNL3.2 报告基因热原检查法测定疫苗热原的适用性研究[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(3): 354-358.

Adaptability Research of HL60-pNL3.2 Reporter Gene Assay in Pyrogen Detection of Vaccines

WANG Can, LIU Lizhen, CHEN Gang, SHAO Hong^{*} (Shanghai Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the application of HL60-pNL3.2 reporter gene assay in pyrogen detection of live attenuated varicella vaccine, inactivated influenza vaccine and lyophilized live attenuated hepatitis A vaccine. **METHODS** According to the publication draft named as "in vitro pyrogen test(reporter gene assay)" in Chinese Pharmacopoeia, maximum valid dilution(MVD) of three kinds of vaccines was calculated, and the interference test was conducted to explore whether these vaccines interfere with the pyrogen determination. According to the general rule 9101 from Chinese Pharmacopoeia 2020, the assay in the pyrogen detection of the three vaccines was validated, using the methods to determine the pyrogen content of three vaccines. **RESULTS** The MVD of live attenuated varicella vaccine, inactivated influenza vaccine and lyophilized live attenuated hepatitis A vaccine respectively were 1 000, 200 and 1 000 times. The recovery rates of endotoxin(LPS) in the three kinds of vaccine were between 52.5% and 110.1%. The methodological validation results showed that the method could be used for the determination of pyrogens in three vaccines, and the correlation coefficient(R^2) between LPS concentration and its chemical light intensity(RLU value) was > 0.98, the recovery rates were between 76.4% and 192.8% when LPS concentration was between 1 and 250 EU·mL⁻¹. The coefficient of variation of measured results was less than 25% when LPS concentration was more than 5 EU·mL⁻¹. The limit of detection and the limit of quantitation were between 0.05 and 0.13 EU·mL⁻¹. Then, the pyrogen of these vaccines was determined by HL60-pNL3.2 reporter gene assay, and the pyrogen concentration all was less than contaminant limit concentration. **CONCLUSION** HL60-pNL3.2 reporter gene assay has the advantages of no animal, simple and rapid operation, with wide pyrogen spectrum and can quantitative pyrogen, which can be used to detect pyrogen of live attenuated varicella vaccine, inactivated influenza vaccine and lyophilized live attenuated hepatitis A vaccine.

KEYWORDS: pyrogen detection; reporter gene assay; live attenuated varicella vaccine; inactivated influenza vaccine; lyophilized live attenuated hepatitis A vaccine

基金项目: 上海市科技计划项目 (21142202900); 上海市研发公共服务平台项目 (19DZ2294600)

作者简介: 王灿, 女, 博士, 副主任药师 E-mail: wangcancan3860@126.com *通信作者: 邵泓, 女, 主任药师 E-mail:

Shaohong@smda.sh.cn

疫苗在为人类带来健康的同时，其安全问题也成为民生关注的热点^[1-2]。发热是疫苗常见的不良反应之一，引起发热的主要原因除疫苗自身特性外，还与疫苗中的热原物质有关^[3]。因此，热原检测是疫苗质量控制的关键项目。笔者所在实验室前期建立了 HL60-pNL3.2 报告基因热原检查法^[4]，本研究探讨该方法在水痘减毒活疫苗、流感病毒裂解疫苗、冻干甲型肝炎减毒活疫苗热原检查中的应用，为疫苗类制品热原测定拓展新思路。

1 试剂、材料和仪器

1.1 试剂和材料

内毒素 (endotoxin, LPS) 国家标准品 (中国食品药品检定研究院；批号：150601-201681；规格：80 EU·支⁻¹)；IMDM 培养液 (批号：2239679)、胎牛血清 (批号：1966174C) 均购自美国 Gibco 公司；Nano-Glo[®] Luciferase Assay System 显色剂 (美国 Promega 公司，批号：483907)；细菌 LPS 检查用水 (湛江安度斯生物有限公司，批号：2006160)。

水痘减毒活疫苗 (A 厂家，批号：202003021)；流感病毒裂解疫苗 (A 厂家，批号：202006004)；冻干甲型肝炎减毒活疫苗 (B 厂家，批号：202003008)。

HL60-pNL3.2 稳转细胞株 (实验室自制)。

1.2 仪器

Envision 型酶标仪 (美国 PERKINELMER 公司)；Series 8000W 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific)；BA400 型倒置三目显微镜 (中国麦克奥迪公司)；TW12 型水浴锅 (德国 Julabo)；5702 型低温高速水平离心机 (美国 Eppendorf)；NC200 型细胞计数仪 (丹麦 ChemoMetec Nucle Counter)；XH-D 型旋涡混合器 (江苏天翎)。

2 方法和结果

2.1 污染物限值 (contaminant limit concentration, CLC) 和最大有效稀释倍数 (maximum valid dilution, MVD) 的计算

参照中国药典“体外热原检查法 (报告基因法)”公示稿，按 $CLC=K/M$ 计算 3 种疫苗 CLC。因中国药典 2020 年版收载的此 3 种疫苗各论中的 LPS 限值均低于计算的 CLC 值，故采用药典收载的 LPS 限值作为 3 种疫苗的 CLC，见表 1。按 $MVD=CLC \times C/LOD$ 公式分别计算 3 种疫苗的

MVD，其中， C 为供试品溶液的浓度，若 CLC 的单位是 $EU \cdot mL^{-1}$ ，则 C 以 $1.0 mL \cdot mL^{-1}$ 计；LOD 为检测限 (limit of detection)，该方法的检测限预实验结果为 $0.1 EU \cdot mL^{-1}$ ，故按 LOD 为 $0.1 EU \cdot mL^{-1}$ 计算 3 种疫苗的 MVD。结果见表 1。

表 1 各供试品内毒素限值及最大有效稀释倍数

Tab. 1 Endotoxin limit and maximum valid dilution of samples

供试品	内毒素限值/ $EU \cdot mL^{-1}$	检测限/ $EU \cdot mL^{-1}$	最大有效 稀释倍数
水痘减毒活疫苗	100	0.1	1 000
流感病毒裂解疫苗	20	0.1	200
冻干甲型肝炎减毒活疫苗	100	0.1	1 000

2.2 HL60-pNL3.2 报告基因热原检查法^[4]

参照中国药典“体外热原检查法 (报告基因法)”公示稿配制标准品溶液、供试品溶液、干扰试验供试品溶液和阴性对照溶液。取处于对数生长期的 HL60-pNL3.2 稳转细胞株，每孔接种 5×10^5 个细胞于 96 孔板，加入不同浓度标准品溶液、供试品溶液、干扰试验供试品溶液和阴性对照溶液 (均设 4 个复孔) $50 \mu L$ ， $37^\circ C$ ，5% 二氧化碳条件下培养 3~4 h，每孔加入 Nano-Glo[®] Luciferase Assay System 显色剂 $50 \mu L$ ，酶标仪读取化学光强度 (RLU)。以 LPS 标准品溶液浓度为横坐标 (对数坐标)，RLU 值为纵坐标，作四参数 logistic 回归，拟合标准曲线。将供试品溶液测得 RLU 值代入标准曲线中，计算供试品溶液热原含量。

2.3 干扰实验

参照中国药典“体外热原检查法 (报告基因法)”公示稿，进行干扰实验。选择靠近标准曲线中点的浓度 ($8 EU \cdot mL^{-1}$)，作为供试品干扰溶液所含 LPS 浓度。用建立的 HL60-pNL3.2 报告基因热原检查法测定供试品溶液、供试品干扰溶液和 $8 EU \cdot mL^{-1}$ LPS 溶液中的 LPS 含量。将干扰试验供试品溶液测得的 LPS 值 (A)、供试品溶液测得的 LPS 值 (B) 和添加的 LPS 值 (C)，带入式 (1)，计算本试验条件下 LPS 回收率 (R)。

$$R = (A - B/C) \quad (1)$$

当回收率在 50%~200%，则认为在此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用。当回收率不在指定的范围内，须排除干扰因素，并重复干扰试验来验证处理的有效性。

LPS 在水痘减毒活疫苗、流感病毒裂解疫

苗、冻干甲型肝炎减毒活疫苗稀释液中回收率结果见表2,结果表明水痘减毒活疫苗稀释50倍时对LPS的测定有干扰,回收率为45.0%,稀释100,200,400倍时对LPS测定无干扰。流感病毒裂解疫苗、冻干甲型肝炎减毒活疫苗50倍、100倍和200倍稀释液均对LPS测定均无影响,回收率在52.5%~110.1%。测定结果表明在MVD范围内,3种疫苗对LPS的测定均不存在干扰,HL60-pNL3.2报告基因热原检查法可用于3种疫苗热原检测。

表2 各疫苗供试品不同稀释倍数LPS回收率结果($n=3$)
Tab. 2 Results of LPS recovery rates for different dilution ratios of vaccine test samples($n=3$)

供试品	稀释度	回收率/%
水痘减毒活疫苗	50	45.0
	100	69.1
	200	90.3
	400	100.5
流感病毒裂解疫苗	50	59.8
	100	110.1
	200	102.3
冻干甲型肝炎减毒活疫苗	50	52.5
	100	57.5
	200	87.5

2.4 方法学验证

参照2020年版中国药典通则9101分析方法验证指导原则,对HL60-pNL3.2报告基因热原检查法测定3种疫苗热原进行方法学验证。

2.4.1 线性考察 分别配制水痘减毒活疫苗100倍稀释液,流感病毒裂解疫苗和冻干甲型肝炎减毒活疫苗50倍稀释液,分别用3种疫苗的稀释液配制含125,25,5和1 EU·mL⁻¹ LPS的溶液。用HL60-pNL3.2报告基因热原检查法测定不同浓度的LPS溶液产生的RLU值,以LPS浓度为横坐标(对数坐标),以测得的RLU值为纵坐标,绘制线性曲线,相关系数 R^2 应>0.95。

水痘减毒活疫苗、流感病毒裂解疫苗和冻干甲型肝炎减毒活疫苗3种疫苗稀释液配制的LPS溶液量效关系见图1~3,相关系数(R^2)分别为0.9868,0.9918和0.9975,均>0.98,线性关系良好。

2.4.2 准确度和重复性考察 用3种疫苗稀释液分别配制250,125,25,5,1 EU·mL⁻¹ LPS溶

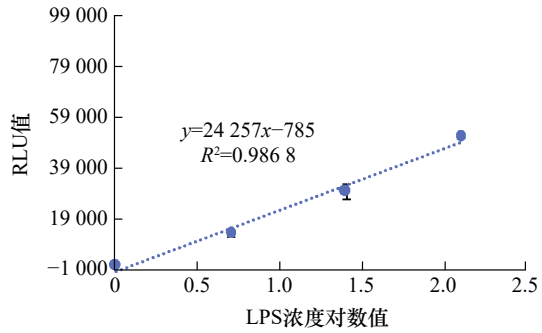


图1 水痘减毒活疫苗100倍稀释液配制的LPS溶液量效关系图

Fig. 1 Dose effect relationship diagram of LPS solution prepared with 100 times dilution of live attenuated varicella vaccine

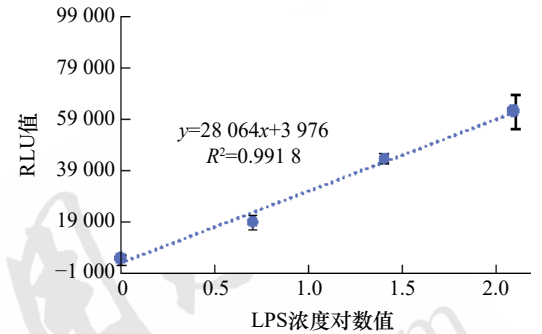


图2 流感病毒裂解疫苗50倍稀释液配制的LPS溶液量效关系图

Fig. 2 Dose effect relationship diagram of LPS solution prepared with 50 times dilution of inactivated influenza vaccine

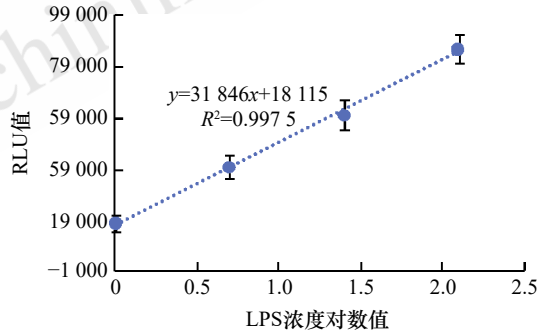


图3 甲型肝炎减毒活疫苗50倍稀释液配制的LPS量效关系图

Fig. 3 Dose effect relationship diagram of LPS solution prepared with 50 times dilution of lyophilized live attenuated hepatitis A vaccine

液,HL60-pNL3.2报告基因热原检查法测定其LPS含量,测定值与理论值之比即为LPS回收率,每个浓度的溶液重复测定6次。3种疫苗供试品在LPS浓度为1~250 EU·mL⁻¹时,回收率结果为76.4%~192.8%,LPS浓度>5 EU·mL⁻¹时,重复性变异度(CV)均<25%,结果见表3。

表3 3种疫苗供试品准确度和重复性结果 (n=6)

Tab. 3 Results of accuracy and repeatability for the three kinds of vaccines(n=6)

LPS浓度真 实值/EU·mL ⁻¹	水痘减毒活疫苗			流感病毒裂解疫苗			甲型肝炎减毒疫苗		
	实测值/EU·mL ⁻¹	回收率/%	CV/%	实测值/EU·mL ⁻¹	回收率/%	CV/%	实测值/EU·mL ⁻¹	回收率/%	CV/%
250	198.7	79.5	18.0	191.1	76.4	21.6	205.6	82.2	11.6
125	116.1	92.9	7.7	115.8	92.6	14.7	115.5	92.4	8.8
25	37.8	151.3	13.8	39.2	156.7	7.1	29.2	116.9	7.9
5	9.0	180.2	24.0	9.6	192.8	20.0	9.4	187.4	24.1
1	1.9	189.3	25.1	1.6	160.7	41.6	1.1	112.9	37.8

2.4.3 检测限和定量限考察 以无干扰的疫苗供试品稀释液取代 LPS 标准品溶液，作为阴性对照。将阴性对照的 RLU 平均值和其 3 倍标准差 ($\bar{x}+3SD$) 代入标准曲线，计算该方法检测不同疫苗热原的检测限。将阴性对照的 RLU 平均值和其 10 倍标准差 ($\bar{x}+10SD$) 代入标准曲线，计算该方法检测疫苗热原的定量限。

水痘减毒活疫苗、流感病毒裂解疫苗和冻干甲型肝炎减毒活疫苗检测限分别为 0.10, 0.05 和 0.09 EU·mL⁻¹，定量限分别为 0.13, 0.06 和 0.10 EU·mL⁻¹，结果见表 4。

表4 HL60-pNL3.2 热原报告基因法测量 3 种疫苗 LPS 检测限和定量限 (n=3)

Tab. 4 LPS limit of detection and limit of quantitation of HL60-pNL3.2 reporter gene assay in the pyrogen detection of the three vaccines(n=3)

供试品	Cut-off 平均值	SD	检测限/ EU·mL ⁻¹	定量限/ EU·mL ⁻¹
水痘减毒活疫苗	4 078.1	439.4	0.10	0.13
流感病毒裂解疫苗	1 920.9	151.4	0.05	0.06
甲型肝炎减毒疫苗	1 009.9	81.9	0.09	0.10

2.5 供试品热原测定结果

参照中国药典《体外热原检查法 (报告基因法)》公示稿配制供试品溶液 A, B 和 C, 按“2.2”项下方法进行热原测定。将供试品溶液测得 RLU 值代入标准曲线, 得供试品 A, B 和 C 溶液 LPS 浓度, 再乘以相对应的稀释倍数后, 得供试品溶液 LPS 浓度, 测定结果见表 5。水痘减毒活疫苗、流感病毒裂解疫苗、冻干甲型肝炎减毒活疫苗 3 种疫苗 3 个稀释度下 LPS 含量均低于 LPS 限值, 均符合规定。

3 讨论

热原是非肠道用药, 特别是静脉注射用药重要的安全性检测指标^[5-6]。目前药典收录的热原检测方法有家兔法 (rabbit pyrogen test, RBT)、细菌

表5 供试品热原测定结果

Tab. 5 Results of pyrogen detection in samples

供试品	供试品 溶液	稀释 倍数	供试品溶液内毒 素浓度/EU·mL ⁻¹	供试品内毒素浓 度/EU·mL ⁻¹
水痘减毒活疫苗	A	100	0.028	2.80
	B	200	0.020	4.00
	C	400	0.015	6.00
流感病毒裂解疫苗	A	50	0.047	2.35
	B	100	0.022	2.20
	C	200	0.021	4.20
甲型肝炎减毒疫苗	A	50	0.035	1.75
	B	100	0.021	2.10
	C	200	0.017	3.40

内毒素法 (bacterial endotoxin test, BET) 和单核细胞激活实验法 (monocyte activation test, MAT)。RBT 自 1942 年被纳入美国药典以来一直是热原检测的金标准, 但其检查结果受家兔品种和实验条件影响较大, 重复性较差, 灵敏度较低, 且只能对热原进行定性, 无法定量。BET 仅检测细菌 LPS, 无法检测其他种类热原, 且关键试剂鲎试剂需使用国家二级保护动物鲎, 随着鲎资源的匮乏, 该方法的推广和应用也面临严峻考验。MAT 于 2010 年首次收载于欧洲药典 (EP6.7), 英国药典 (BP) 从 2011 年开始收载, 中国药典 2020 年版首次收载。该方法虽然可以弥补 RBT 和 BET 的不足, 但是仍存在操作繁琐, 耗时长等缺陷^[7-9]。基于目前热原检测方法的局限性, 需发展新的热原检测方法。

报告基因法具有操作简便、耗时短、灵敏度高优点, 已应用于生物技术药物质量控制中, 目前国内外也已有学者相继对热原报告基因法进行了报道^[10-11]。本实验室前期建立了一种基于人白血病 HL60 细胞的热原报告基因法^[4], 该方法是在 HL60-IL6 单核细胞活化反应测定法 (MAT 法) 的基础上建立的, 保留了 MAT 法检测热原谱广, 可

对热原进行定量的优点,但与 MAT 法相比,该方法无需进行细胞因子的测定,操作更简单,检测时间也由 MAT 法 ≥ 48 h 缩短至 3 h。本研究探讨该方法在水痘减毒活疫苗、流感病毒裂解疫苗和冻干甲型肝炎减毒活疫苗热原检测中的应用。

中国药典 2020 年版规定水痘减毒活疫苗、流感病毒裂解疫苗、冻干甲型肝炎减毒活疫苗 LPS 含量检测方法均为凝胶限度试验,而凝胶限度试验只能定性检测革兰氏阴性菌来源的 LPS,无法检测其他种类的热原。3 种疫苗均为病毒性疫苗,生产材料均来自病原微生物,除存在 LPS 外,还存在其他种类热原污染的风险,需对热原进行全面的检测。本研究将 HL60-pNL3.2 热原报告基因法应用于 3 种疫苗热原定量检测,并通过方法学验证判断该方法是否适用 3 种疫苗的热原检测。方法学验证结果显示, LPS 在 $5\sim 250$ EU $\cdot$ mL $^{-1}$,方法重复性 CV 值均 $<25\%$ 。但当 LPS 浓度 <5 EU $\cdot$ mL $^{-1}$ 时, CV 值变大,回收率偏高。产生这种现象的原因很可能与疫苗成分相关,本研究采用病毒性疫苗,疫苗中本身可能含有能够与 Toll 样受体结合的成分,激活信号通路,促使荧光素酶分泌。因此, HL60-pNL3.2 热原报告基因法可以作为疫苗 LPS 限度检查的补充方法进行热原定量检测,但需经充分的方法适用性研究。

中国药典委网站已公示“体外热原检查法(报告基因法)”,这是国内外药典首次收载基于报告基因的热原检查法。该公示稿参照欧洲药典、英国药典“MONOCYTE-ACTIVATION TEST”和中国药典通则 9301“注射剂安全性检查法应用指导原则”项下“单核细胞活化反应测定法”拟定,需制备 3 个稀释度的供试品溶液,3 个稀释倍数下得到供试品溶液 LPS 浓度不需进行合并计算,分别和 LPS 限值进行比较,均低于 LPS 限值,认为供试品 LPS 符合规定。本研究通过探讨 HL60-pNL3.2 热原报告基因法在水痘减毒活疫苗、流感病毒裂解疫苗和冻干甲型肝炎减毒活疫苗热原检

测中的应用,为疫苗类制品热原测定拓展了新思路,有助于理解并推动中国药典委“体外热原检查法(报告基因法)”通则草案的实施。

REFERENCES

- [1] ZHANG S B, LI T T, XUE W H, et al. Recent progress in vaccine technology[J]. *Int J Biol*(国际生物制品学杂志), 2022, 45(1): 8-17.
- [2] GUO H Z, YANG M H, YANG H C, et al. Discussion on the core concept for viral safety of biological products[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2020, 29(24): 2781-2788.
- [3] CAI T, ZHANG Y, HE Q, et al. The suitability of meningococcal groups ACYW135 polysaccharide vaccine for human peripheral blood mononuclear cell(PBMC) *in vitro* pyrogen test[J]. *Sci Technol Rev*(科技导报), 2017, 35(17): 88-91.
- [4] WANG C, WANG M R, LIU L Z, et al. Development and validation of a novel luciferase reporter gene assay to detect pyrogen[J]. *Biologicals*, 2022(77): 16-23.
- [5] KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Pathogen recognition by the innate immune system[J]. *Int Rev Immunol*, 2011, 30(1): 16-34.
- [6] ROSENFELD Y, SHAI Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(9): 1513-1522.
- [7] ZHANG Y, CAI T, WU Y L, et al. Suitability of human whole blood *in vitro* pyrogen test for meningococcal groups ACYW135 polysaccharide vaccine[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2015, 50(11): 983-986.
- [8] ZHANG Y, CAI T, DU Y, et al. Suitability of human whole blood *in vitro* pyrogen test to two vaccines[J]. *Chin J Biol*(中国生物制品学杂志), 2018, 31(9): 995-998.
- [9] DONG S S, WANG C, ZHOU Q, et al. Application of monocyte activation test in the pyrogen detection of vaccine[J]. *China Pharm*(中国药师), 2016, 19(5): 870-873.
- [10] PALMER B W, STROM K, WONG C. Hand-assisted laparoscopic nephroureterectomy with cystoscopic en-bloc excision of the distal ureter and bladder cuff and isthmusectomy in a horseshoe kidney for invasive urothelial carcinoma of the renal pelvis[J]. *JSLs*, 2011, 15(3): 412-414.
- [11] HE Q, YU C F, WANG L, et al. A novel reporter gene assay for pyrogen detection[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2020, 73(2): 111-118.

收稿日期: 2023-03-09

(本文责编: 陈怡心)