

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.003632

· 专题报道 ·

腺病毒载体疫苗药学评价的思考

徐莉, 李敏

国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022

关键词: 腺病毒载体; 疫苗; 药学评价; 质量控制

中图分类号: R183.9 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2022)06-0763-06

腺病毒为无包膜双链 DNA 病毒,分为哺乳动物腺病毒属和禽类腺病毒属。至今已分离鉴定人腺病毒 100 多个型别,6 个亚群(A~F),50 多种血清型。腺病毒感染免疫功能正常的人后多表现为自限性^[1]。

腺病毒具有稳定的基因组、不整合至人体基因、有多种血清型供选择等优势^[1],已作为基因递送载体用于基因治疗产品^[2]及疫苗的开发。腺病毒载体已广泛用于包括埃博拉病毒、HIV、流感病毒、呼吸道合胞病毒、疟原虫、结核分枝杆菌、丙型肝炎病毒、新型冠状病毒等候选疫苗的研发中^[3]。其中,基于人腺病毒 5 型、26 型和黑猩猩腺病毒作为载体的新型冠状病毒疫苗已获附条件上市^[4]或紧急使用^[5,6],相关产品开发及使用目前正在进行中。本文简要综述了腺病毒载体疫苗的研究进展,从细胞基质、毒种、生产工艺及质量控制等方面,结合相关法规要求及国内外指南等,对此类产品的药学评价考虑进行探讨,为该类产品研制及注册等提供参考。

1 用于疫苗生产的腺病毒载体改造

目前,研究应用最广泛的腺病毒载体为人 Ad5,但考虑到人群中腺病毒血清型流行及腺病毒预存抗体情况,也选择应用人类稀有的血清型或者非人类如黑猩猩腺病毒等作为载体,从而克服对载体的预存免疫。

腺病毒基因组中包括方向末端重复序列(ITR)、包装信号(Ψ)、早期转录单位(E1~E4)和晚期转录单位(L1~L5),早期转录单位的表达为病毒 DNA 的复制奠定了基础^[7]。早期转录单位也是腺病毒载体改造的重点区域,疫苗生产用腺病毒载体通常改造为复制缺陷型重组腺病毒载体。

腺病毒载体的改造通常与其包装用细胞的改造配套进行。如删除腺病毒复制所必需的 E1 基因区

域,为外源基因插入提供空间同时使病毒尚失复制能力。同时将人 Ad5 的 E1 区域(E1A 和 E1B 基因)稳定整合至 HEK293 细胞染色体中,HEK293 细胞及其衍细胞株(如 T-REx-293 细胞系)表达 E1 区基因,改造后细胞可用于删除 E1 区域复制缺陷的腺病毒复制^[8]。又如通过使用由四环素阻遏蛋白(tet repressor protein, TetR)和四环素操纵子(tet operator, TetO)组成的阻遏蛋白-操纵子系统抑制腺病毒载体生产过程中的转基因表达,从而可提高病毒产量^[9]。以 PER.C6 TetR 细胞系与 Ad26 病毒载体系统为例^[10],将 TetO 序列插入 Ad26 载体转基因上游的 CMV 启动子序列中,构建重组腺病毒载体,同时将 TetR 基因整合至 PER.C6 细胞构建 PER.C6 TetR 细胞系,表达 TetR 蛋白。TetR 蛋白通过与插入腺病毒载体中转基因表达盒启动子序列中的 TetO 结合,从而阻断转录启动,降低转基因表达。

此外,对于腺病毒载体的改造,有时还需考虑尽量避免发生同源重组产生复制腺病毒(replication competent adenovirus, RCA)。如 HEK293 细胞整合 E1 序列包含足够的侧翼腺病毒序列,可与载体发生同源重组,从而导致产物被含 E1 的 RCA 污染^[11]。PER.C6 细胞经过工程改造,使其包含最小区域,可防止重组并减少 RCA 的发生^[12]。也可考虑删除复制所需的其他病毒基因,如同时删除 E1、E3 以及 E2 和/或 E4 区域^[13],具有多种缺失可明显降低产品中 RCA 污染的可能性,但需要开发特异的生产细胞系。

2 腺病毒载体疫苗的药学研究开发

国内外已发布可指导病毒载体疫苗研究开发的多项技术指导原则/法规/指南等。包括《人基因治疗研究和制剂治疗控制技术指导原则》^[14]、《中国药典》^[15]“人用基因治疗制品总论”及“疫苗总论”、

通信作者: 李敏, E-mail: lim@cde.org.cn

WHO《埃博拉病毒疫苗指南》^[16]及国内外载体疫苗相关技术指南^[17-19]等,可用于指导此类产品的研究开发。

2.1 载体设计及构建 重组载体构建一般包括载体设计、载体构建、构建载体的确证等。通常应对腺病毒载体开发的基本原理进行描述,应明确构建的载体中所有基因组成及其功能来源,所有有义和无义的基因修饰,如任何位点特异性突变、插入、缺失和/或重排,均应与天然序列进行比较。如载体构建中包含插入控制目的抗原表达的基因元件,应提供研究数据证明其可行性。

腺病毒载体生产毒株的构建一般采用质粒系统通过适宜的细胞基质重组构建并经克隆噬斑筛选、纯化后制备,筛选的指标一般包括腺病毒基因组的完整性、目的蛋白表达正确性及表达效率、外源因子检测、传代稳定性研究等。应详细描述构建疫苗载体的方法,并对最终构建的病毒载体进行遗传学特性分析;描述从原材料(腺病毒载体、基因、质粒等)衍生到病毒主种子水平的所有步骤。

对于构建的重组腺病毒载体,应对病毒基因组的完整序列进行分析,或至少应确认重要区域如目的抗原基因和调控元件区域,以及被认为修改的任何区域及其侧翼区域的序列,测定序列应与理论序列一致。对于异源插入基因序列的任何改变应进行调查,并证明其不影响目的氨基酸序列(即保守改变)或疫苗的抗原特性。除基因序列测定外,应考虑进行重组载体的限制性内切酶图谱分析。

2.2 起始原材料

2.2.1 病毒种子批 通常需对病毒主种子进行完整的描述,包括遗传和表型特性等。一般要描述与异源基因(包括相关连接区)表达有关的各个元件,进行核苷酸序列分析与亲本载体进行比较,辅以限制性内切酶图谱、Southern 印迹、PCR 或 DNA 图谱等分析。应进行遗传稳定性研究,证明疫苗种子可达到与最终原液相当的传代水平,最好超过预期的最大传代水平,研究包括遗传基因稳定性、目的基因表达稳定性和生产稳定性等。其中,遗传稳定性研究可考虑重点考察传代过程中 RCA、目的基因拷贝数及序列的改变等;目的基因表达稳定性侧重于异源抗原的修饰(如有)和表达(如抗原表达量、抗原鉴别等),同时考虑对感染性滴度及病毒颗粒数等进行分析。

对于构建的生产用毒种库应符合《中国药典》三部(2020 版)“生物制品生产检定用菌毒种管理及质量控制”规定。根据具体情况设定质控项目,一

般包括如鉴别试验(载体和目的基因)、病毒滴度、外源污染因子检查(无菌、分枝杆菌、支原体、外源病毒因子检查)、逆转录病毒、种属特异性病毒、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)、RCA 检测、重要功能基因和遗传标志物测定、免疫原性检查及全基因序列测定等。通常毒种库需送第三方进行复核检定。

实际大规模生产过程中,病毒接种量通常需求较大,开发者可能会为保证持续生产,研究在三级毒种库的基础上建立中间毒种库。如因生产工艺需要建立中间毒种库,需对中间毒种库建立放行标准及内部控制标准。对于中间毒种库,应重点考虑对外源因子传播风险的控制。如建立的毒种库及采用的生产工艺过程控制可良好控制外源因子污染风险,则中间毒种库检定方式可由研发者自行根据对照细胞检定等风险分析,并权衡利弊综合考虑。对于中间毒种库,通常应重点监测病毒滴度、无菌检查、外源因子和支原体等,考虑到培养法对特异型支原体如猪鼻支原体等灵敏度不高,对于支原体检测采用《中国药典》三部(2020 版)培养法的同时,补充开展核酸法检测是非常必要的。此外,中间毒种库的保存条件及使用期限的确定需基于贮存稳定性研究,在实际生产使用过程中可考虑按照最短时间方式使用中间毒种库。

2.2.2 生产细胞库 目前,应用最广泛的腺病毒载体疫苗生产用细胞包括 HEK293 细胞和 PER.C6 细胞等。通过对细胞进行改造,如整合 Ad5 型的 E1 基因、整合 TetR 基因等,可使复制缺陷型重组腺病毒在细胞中复制,同时抑制目的抗原蛋白的表达提高病毒滴度。通过对细胞进行驯化,采用无血清悬浮高密度培养,可满足大规模生产的要求。

对于细胞库的构建,通常应建立细胞库构建历史记录,记录应包括有关其来源、鉴定、改造等信息。需说明包装细胞系构建的全部细节,包括辅助病毒核酸(如有)及其编码蛋白质/功能的性质和特性。如有,还应提供辅助病毒核酸的染色体位置信息。

需对细胞系的遗传稳定性进行研究。细胞遗传稳定性常通过比较前细胞或主细胞库水平上的细胞系关键区域(和侧翼区域)与其预期最大传代水平或超过预期最大传代水平的序列进行评估。通常根据传代稳定性研究数据确定从主细胞库(master cell bank, MCB)到工作细胞库(working cell bank, WCB)以及疫苗生产代次所允许的最大传代次数或群体倍增水平(population doubling level, PDL)(根据悬浮细

胞细胞的增殖特性,一般在实际开发及生产过程中对生产细胞统一采用 PDL 进行计算和控制)。

研究建立的生产用主细胞库和工作细胞库除应符合《中国药典》三部(2020 版)“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”相关规定外,还应考虑额外的检测,如人源病毒、AAV、RCA 等检测。

2.3 原材料及辅料 生产过程中使用的原辅料应符合《中国药典》三部(2020 版)相关要求,包括毒种、细胞库构建过程中使用的原材料。对可能影响产品安全的原材料,应评估在终产品或工艺最适阶段中的残留情况。对于动物来源材料,应评估其来源及生产过程对产品带来的外源因子风险,如牛血清和/或猪胰蛋白酶,检测牛源和/或猪源病毒,且应证明不存在细菌、真菌和支原体等,动物源性物质还应符合相关的传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathy, TSE)指导原则,将外源因子污染的风险降至最低。

2.4 生产工艺开发及生产过程的控制 腺病毒载体疫苗的制备工艺通常包括细胞扩增、病毒感染、收获、裂解、澄清、纯化、原液、半成品配制和成品制备等步骤。对于原液制备,通常采用批试培养或灌流培养方式制备目的腺病毒。灌流培养一般可较批试培养采用的细胞密度更高,且收获的病毒滴度更高。纯化工艺的开发应重点关注病毒滴度、病毒颗粒数的回收以及杂质如宿主细胞蛋白、宿主细胞 DNA、核酸酶等的去除等。

腺病毒载体疫苗制剂处方开发是影响此类产品稳定性及流通使用的难点。一般根据用法用途、病毒本身理化性质及其生物学特性开发制剂处方。对于活性成分通常采用病毒颗粒进行规格的拟定,具体剂量将通过非临床及临床研究予以确认。腺病毒疫苗产品制剂成分通常包括缓冲剂、冷冻保护剂、盐、非离子表面活性剂等。如 pH 为影响病毒活性的重要因素,可通过腺病毒的最适 pH^[20]选择合适的缓冲体系;为抑制冻融相关的病毒感染滴度损失并维持制剂渗透压,应选择合适的盐及冷冻保护剂;为提高其物理稳定性,通常选择加入非离子表面活性剂减少界面吸附。研究表明,在二价阳离子存在下可维持腺病毒的热稳定性^[21],二价阳离子通过与基因组中磷酸盐基团的静电相互作用来提高基因组的稳定性^[22]。此外,为抑制自由基氧化和稳定病毒感染性,还可考虑加入金属离子螯合剂和羟基自由基清除剂等^[23]。如有同一平台的腺病毒产品已进入临床或批准上市,其制剂处方可作为重要参考。

对于生产过程的控制及验证,整体上同疫苗生

产的通用原则,应基于确定关键工艺参数、关键质量属性,设置过程控制项目并制定相应可接受标准对生产过程进行控制及验证,以确保工艺的重现性、稳健性和产品的批间一致性。生产过程控制一般包括病毒培养物的制备以及纯化、原液、半成品、成品制备的工艺过程。对于活病毒产品而言,鉴于目的病毒的大小和物理特性,可能无法采用过滤或改变 pH 来去除外源病毒,应实施全面质控策略,包括原料、细胞库及病毒种子库、生产收获液及对照细胞培养等。

3 腺病毒载体疫苗的质量控制

3.1 特性分析

3.1.1 结构分析 一般包括蛋白和基因两个层面。如对病毒蛋白(包括衣壳及核心蛋白)进行鉴别;对目的抗原基因及其两翼序列进行测序分析,并对目的病毒进行适宜的限制性内切酶酶切图谱分析等。

3.1.2 含量及生物学活性 含量指标通常包括病毒颗粒数和感染性滴度,可通过两指标比值确定比活,为生物学活性指标之一。腺病毒载体类疫苗病毒滴度无法直接推断产品的有效性,如生产过程中目的基因是否丢失,尤其当产品出现 RCA 时。通常,初步可通过检测抗原定量表达和动物免疫原性反应生物学活性。可进一步通过开展病毒滴度与目的抗原蛋白及比活和动物效力试验相关性的研究,开展对目的抗原的表达率、抗体结合效力与具有人体保护水平的病毒中和抗体效力以及与真病毒或假病毒中和抗体效力的相关性研究等,最终建立和确定简化的生物学活性表征和质量控制指标。

3.1.3 纯度、杂质和污染物

3.1.3.1 工艺相关杂质 对于腺病毒载体类疫苗产品,工艺相关杂质通常主要包括宿主细胞 DNA、宿主细胞蛋白、生产工艺中可能添加的消泡剂、抗结团剂、细胞裂解剂以及核酸酶等,工艺步骤应能对相关杂质有效去除,开发者应对其残留量进行研究并建立残留量限度控制标准。

以重点关注的工艺相关杂质残留 DNA 为例,包括病毒核酸和宿主细胞 DNA。DNA 的存在会干扰纯化柱层析,干扰病毒颗粒的定量检测,且低水平的 DNA 与目的病毒聚集相关^[24]。出于安全考虑,对于致瘤性生产细胞系需严格控制宿主细胞 DNA 残留量及片段大小,推荐 DNA 残留量控制在 10 ng/剂以下^[25],片段大小控制在 200 bp 以下^[26]。开发者应采用经验证的方法对各工艺步骤 DNA 的去除及

残留(包括残留量及片段大小)进行研究。以目前相对广泛使用的宿主细胞 HEK293 为例,基于 HEK293 细胞基因组的高度不稳定、高致瘤性等特点,产品开发过程中对宿主细胞残留 DNA 片段大小及其分布进行深入研究非常必要,通常应考虑采用两种不同原理的检测方法进行佐证研究,如 qPCR、毛细管电泳法等。对于毛细管电泳法,考虑到样品中宿主细胞 DNA 实际残留量及该方法检测限水平,需选择 DNA 残留量较高阶段的样品进行 DNA 片段大小分布研究,如核酸酶解后样品。

3.1.3.2 产品相关杂质 腺病毒载体疫苗产品相关杂质可能包括 RCA、空壳病毒^[27-28]、不完整病毒颗粒、病毒聚集体、游离腺病毒蛋白、腺病毒蛋白降解物或翻译后修饰产物等,这些杂质可能对产品安全性和有效性产生潜在影响。因此实际研发及生产过程中应考虑采用不同的方法对不同生产阶段产物及贮存期间上述杂质的变化进行分析。如采用细胞培养法和 qPCR 法检测 RCA,沉降率-分析超速离心检测空壳或不完整病毒颗粒,DLS 法检测病毒聚集体等。

3.1.4 其他特性 一般包括但不限于如病毒 DNA 测序、对转基因及载体病毒骨架的鉴别、目的抗原表达谱、病毒相对分子质量、病毒粒度分布等。

3.2 标准物质 关于标准品的建立,总体上建议可参照《中国药典》“人用基因治疗制品总论”^[15]等相关要求,对于生物学活性、感染滴度、病毒颗粒数等检测指标建立和制备相关参考品,通常考虑采用经全面结构确证的临床研究批次样品制备生物学活性相关参考品。

3.3 稳定性考察 通常将对温度等条件较敏感的指标作为考察项目,如病毒滴度、比活等,同时可考虑对病毒颗粒大小、病毒聚集体、病毒降解蛋白等进行考察。基于玻璃状态的蛋白和病毒不能发生扩散或构象变化,病毒可长期储存在其玻璃转化温度以下。如因实际需求,对于腺病毒载体疫苗产品原液和成品的贮存及运输处于不同温度条件,涉及产品冻融等情况,开发者应对此类混合存放方式进行严格的验证并进行明确的限制。

3.4 产品检定 质控通常包括生产过程控制和终产品放行质量控制,质控关键阶段样品通常包括病毒收获液、原液、半成品和成品。腺病毒载体疫苗产品质控项目一般包括但不限于:①鉴别试验。如载体鉴别、目的基因及抗原鉴别等;②纯度和杂质。如总纯度、宿主细胞蛋白质/宿主 DNA 残留量、核酸酶残留、复制型腺病毒、腺相关病毒等;③生物学活

性。如比活、抗原表达、免疫原性等;④含量。如病毒感染滴度、病毒颗粒数等;⑤一般性安全试验。如支原体、无菌检查、细菌内毒素检查、异常毒性等;⑥其他检测项目。如可见异物、装量、pH、渗透压摩尔浓度等。

对于效力相关的指标如病毒颗粒数、病毒滴度、目的蛋白表达量等,需参照最低有效剂量包括动物攻毒试验、临床保护力试验、临床免疫原性研究等拟定标准限度下限,参照人体安全性数据拟定质量标准上限^[16]。对贮存期间的敏感指标可设置放行标准和货架期标准。

4 药学评价的考虑

对于此类产品的药学评价一般围绕全过程评价及药学相关风险评价开展。

开发者应提供充分的研究数据证明病毒载体和生产细胞系的来源和安全性,证明产品和生产系统设计良好,每个遗传元素的功能明确及其包含在产品或细胞系中的合理性。应确认预期的基因元件存在于产品和细胞系中,并且产品的最终结构如预期。应提供病毒载体和细胞系遗传成分的来源和结构的完整描述,以及在制造过程中达到(或最好超过)预期最大传代水平的遗传稳定性数据。建立细胞和毒种库并进行全面检定。

关于重组腺病毒载体类疫苗药学相关风险,重点关注该类品种可能存在的外源因子、致瘤性、RCA 等:①对于外源因子的控制。应对产品从毒株建库至整个生产过程中可能引入外源因子进行相关分析和评估,制定对外源因子传播风险的生产工艺全过程控制策略。如对 MCB/WCB、MSL/WSL 进行全面的检定[包括《中国药典》三部(2020 版)要求以外的额外检定];生产全过程尽可能避免动物源性原材料;生产过程中[包括中间毒种库等的制备(如有)]设置对照细胞并进行外源因子检测;对中间毒种库(如有)参照 WSL 要求进行放行检测和内控检测;对生产过程中的收获液开展外源因子放行检测、对原液开展外源因子放行检测等。②对于致瘤性风险控制。工艺开发过程中对中间产物、原液等进行全面 DNA 清除率以及残留 DNA 含量、片段大小和分布研究,以证实残留水平及大小分布符合 WHO 等国际技术指南要求,且工艺清除性能稳定。③对于 RCA 风险的控制。需常规对细胞库、种子库、收获液、原液进行定性 RCA 检测,且应符合拟定的质量标准;监测生产连续传代过程中存在 RCA 增加的可能,如

对毒种、中间毒种库(如有)、收获液、原液以及成品等生产各阶段样品进行定量 PCR 检测,均应符合要求,且未见 RCA 持续增加。

5 结 语

近年来国内外腺病毒载体疫苗的研发和临床试验快速发展,已有多项此类品种目前正处于临床前和或进入临床试验阶段,另有多项获紧急使用或获准附条件上市。部分开发者已建立了较为成熟的工艺平台。

在突发疫情的背景下,整体上而言,采用此类工艺平台进行应急疫苗的开发为获得产品的较快技术路线。如对于新型冠状病毒变异株疫苗的开发,在已有成熟腺病毒载体疫苗平台及附条件上市产品的情况下,理论上针对变异株疫苗的开发可能仅为抗原序列的改变,对工艺、制剂处方、质量标准产生影响的可能性较小,基本可沿用原型疫苗的相关研究资料,开发过程中重点关注内容为疫苗特异性鉴别项目的建立。

已有处于临床试验研究阶段的呼吸道合胞病毒疫苗^[29]采用腺病毒载体疫苗与对应相同抗原重组蛋白疫苗混合接种,旨在诱导高于腺病毒载体疫苗单独接种的中和抗体应答,并在单次免疫后产生较强的细胞应答。为腺病毒载体疫苗使用方式的开发提供了一条较好的思路。

本文基于对腺病毒载体疫苗的已有知识,参考国内已有通用法规、要求,WHO 埃博拉病毒病疫苗指南以及国外腺病毒基因治疗产品、活病毒载体疫苗等相关指导原则,并结合此类产品药学审评情况,对此类产品的药学研究与评价考虑点提出探讨,以便为此类产品的研制及注册等提供参考。随着对此类产品认知的深入及知识的进一步扩充,可能将进一步完善相关考虑点。

参考文献

- [1] ZHANG Q, HU Q Q, WANG F Z, *et al.* Research and development of adenovirus vectored vaccines [J]. *Chin J Vaccin Immun*, 2020, 26 (4): 484-492. (in Chinese)
张倩, 胡倩倩, 王富珍, 等. 腺病毒载体疫苗研发进展 [J]. *中国疫苗和免疫*, 2020, 26 (4): 484-492.
- [2] BISCHOFF J, KIM D, WILLIAMS A, *et al.* An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [J]. *Science*, 1996, 274 (5286): 373-376.
- [3] US National Library of Medicine. The phase I clinical trial of booster vaccination of adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine [EB/OL]. (2020-09-29) [2021-05-01]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04568811?term=vaccine&cond=adenovirus&draw=2&rank=1>.
- [4] 国家药品监督管理局. 国家药监局附条件批准康希诺生物股份公司重组新型冠状病毒疫苗(5型腺病毒载体)注册申请 [EB/OL]. (2021-02-25) [2021-05-03]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaowen/ypjgyw/20210225184523188.html>.
- [5] FDA. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) EUA Information [EB/OL]. (2021-02-27) [2021-05-03]. <https://www.fda.gov/media/146303/download>.
- [6] WHO. WHO lists two additional COVID-19 vaccines for emergency use and COVAX roll-out [EB/OL]. (2021-02-15) [2021-05-03]. <https://www.who.int/news/item/15-02-2021-who-lists-two-additional-covid-19-vaccines-for-emergency-use-and-covax-roll-out>.
- [7] DOUGLAS J T. Adenoviral vectors for gene therapy [J]. *Mol Biotechnol*, 2007, 36 (1): 71-80.
- [8] EMA. COVID-19 vaccine AstraZeneca [EB/OL]. (2021-01-29) [2021-05-03]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/vax-zevria-previously-covid-19-vaccine-astrazenecaepar-public-assessment-report_en.pdf.
- [9] YAO F, SVENSJÖ T, WINKLER T, *et al.* Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9 (13): 1939-1950.
- [10] EMA. COVID-19 vaccine Janssen [EB/OL]. (2021-03-11) [2021-05-03]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/covid-19-vaccine-janssen-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [11] LOCHMULLER H, JANI A, HUARD J, *et al.* Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells [J]. *Hum Gene Ther*, 1994, 5 (12): 1485-1491.
- [12] FALLAUX F J, BOUT A, VAN DER VELDE I, *et al.* New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9 (13): 1909-1917.
- [13] SAYEDAHMED E E, ELKASHIF A, ALHASHIMI M, *et al.* Adenoviral vector-based vaccine platforms for developing the next generation of influenza vaccines [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8 (4): 574.

- [14] 国家药品监督管理局药品审评中心. 人基因治疗研究和制剂质量控制技术指导原则 [EB/OL]. (2008-09-04) [2021-04-01]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=2238c41939119a02>.
- [15] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Vol III) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 35-41, 52-56. (in Chinese)
国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 35-41, 52-56.
- [16] WHO. Guidelines on the quality, safety and efficacy of Ebola vaccines [EB/OL]. (2017-10-17) [2021-03-03]. https://www.who.int/biologicals/expert_committee/BS2327_Ebola_Vaccines_Guidelines.pdf.
- [17] HAVERT M, ANATOL R, IRONY I, *et al.* Regulation of adenoviral vector-based therapies: An FDA perspective // CURIE D T. Adenoviral vectors for gene therapy [M]. Salt Lake City: Academic Press, 2016: 803-832.
- [18] BA YLOR M. EMA / CHMP / VWP / 141697 / 2009 guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines [J]. Pediatrics, 2011, 127: S23-S30.
- [19] EMA. New EDQM document on recombinant viral vectored vaccines to support COVID-19 vaccine developers [EB/OL]. (2020-11-03) [2021-04-01]. <http://www.edqm.eu/en/news/new-edqm-document-recombinant-viral-vectored-vaccines-support-covid-19-vaccine-developers>.
- [20] EVANS R K, NAWROCKI, *et al.* Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines [J]. J Pharm Sci, 2004, 93 (10): 2458-2475.
- [21] TURNBULL A E, SKULIMOWSKI, *et al.* Adeno-associated virus vectors show variable dependence on divalent cations for thermostability: Implications for purification and handling [J]. Hum Gene Ther, 2000, 11 (4): 629-635.
- [22] SEREC K, BABI? S D, PODGORNİK R, *et al.* Effect of magnesium ions on the structure of DNA thin films: an infrared spectroscopy study [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44 (17): 8456-8464.
- [23] ALTARAS N E, AUNINS J G, EVANS R K, *et al.* Production and formulation of adenovirus vectors [J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2005, 99: 193-260.
- [24] KONZ J O, PITTS L R, SAGAR S L. Scaleable purification of adenovirus vectors [J]. Methods Mol Biol, 2008, 434: 13-23.
- [25] SHENG-FOWLER L, LEWIS JR A M, PEDEN K. Issues associated with residual cell-substrate DNA in viral vaccines [J]. Biologicals, 2009, 37 (3): 190-195.
- [26] PEDEN K, SHENG L, PAL A, *et al.* Biological activity of residual cell-substrate DNA [J]. Dev Biol (Basel), 2006, 123: 45-53.
- [27] BURLINGHAM B T, BROWN D T, DOERFLER W. Incomplete particles of adenovirus. I. Characteristics of the DNA associated with incomplete adenovirions of types 2 and 12 [J]. Virology, 1974, 60 (2): 419-430.
- [28] VELLEKAMP G, PORTER F W, SUTJIPTO S, *et al.* Empty capsids in column-purified recombinant adenovirus preparations [J]. Hum Gene Ther, 2001, 12 (15): 1923-1936.
- [29] Janssen Vaccines & Prevention B.V. A study to evaluate the safety and immunogenicity for regimen selection of Ad26.RSV. preF and/or RSV preF protein combinations followed by expanded safety evaluation in adults aged 60 years and older [EB/OL]. (2018-04-19) [2021-05-01]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03502707?term=VAC18193RSV1004&draw=2&rank=1>.

收稿日期: 2021-08-07

编辑: 王佳凤