

• 基础实验研究论著 •

成人剂量型流行性感病毒裂解疫苗的稳定性研究*

周 健, 高菁霞, 马 磊, 刘 婧, 廖国阳, 戴宗祥[△](中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗
研发重点实验室, 云南昆明 650118)

摘 要:目的 了解疫苗在不同温度和不同时间存放的质量变化, 为研制安全有效的流感疫苗提供依据。方法 将流感疫苗放置在 4 ℃ 和 37 ℃ 进行长期稳定性和加速稳定性试验, 不同存放时间点测定流感病毒血凝素(HA)含量及各项质量指标。结果 疫苗经 4 ℃ 保存 18 个月和 37 ℃ 保存 2 周, HA 含量和其他质量指标都符合药典要求。结论 成品流感疫苗在 1 年有效期内均合格。

关键词:流行性感病毒裂解疫苗; 血凝素; 稳定性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)12-1497-03

A study on stability of adult-dose split influenza virus vaccine*

Zhou Jian, Gao Jingxia, Ma Lei, Liu Jing, Liao Guoyang, Dai Zongxiang[△](Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Yunnan Key
Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Kunming, Yunnan 650118, China)

Abstract: Objective To understand the changes of vaccinal qualities stored in different temperatures and at different times and provide basis for developing safe and effective influenza vaccines. **Methods** Influenza vaccines were stored at 4 ℃ and 37 ℃ to perform long-term stability and accelerated stability test. Influenza virus hemagglutinin (HA) content and various quality indicators were determined at different storage time point. **Results** HA content and other quality indicators of vaccines were all in line with requirements of the pharmacopoeia after storage at 4 ℃ for 18 months and at 37 ℃ for 2 weeks. **Conclusion** Finished products of influenza vaccine are all qualified in the validity period of one year.

Key words: split influenza virus vaccine; hemagglutinin; stability

流感病毒具有较强的传染性, 又以呼吸道飞沫传播, 极易引起流行。婴幼儿、年老体弱者, 常在流感后期发生继发性细菌感染, 严重者可危及生命安全。流感病毒表面抗原易产生变异, 是引起世界大流行的主要原因^[1-3]。由于目前治疗流感尚无特效药物, 接种流感病毒疫苗是当今预防流感最有效的措施^[4]。流感疫苗成分包括当前正在人群中流行的甲 1 型(H1N1)、甲 3 型(H3N2)和乙型病毒(B)。WHO 每年对下一个年度流感疫苗组分提出建议^[5]。各流感疫苗生产单位根据 WHO 的建议, 选择相同株或相似株用于生产流感疫苗, 流感病毒血凝素(HA)与流感发生和流行最为密切, HA 是流感病毒表面的一种糖蛋白, 是疫苗的重要成分^[6], 如今较多使用的是含 2 个甲型和 1 个乙型的三价灭活裂解疫苗。该疫苗是将病毒颗粒用适当的裂解剂裂解, 提取有效抗原成分 HA 而制成的, 是疫苗的重要成分。HA 的主要功能是诱导保护性血凝抑制抗体的产生。因此, 研究流感裂解疫苗中 HA 的稳定性, 是疫苗免疫质量的重要保证^[7]。笔者用 2009 年研制的、不加防腐剂的 3 批流感病毒裂解疫苗, 进行了稳定性的实验研究, 期望制备出安全、有效、质量稳定的流感病毒裂解疫苗。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 流感毒株 采用 WHO 2007~2008 年度建议北半球使用的毒株: H1N1 A/Solomon Islands/3/2006 IVR-145; H3N2 A/Wisconsin/67/2005 NYMCX-161B; B B/Malaysia/

2506/2004。

1.1.2 抗原和抗血清参考品 均来源于英国生物制品标准和检定研究所(NIBSC), 包括抗血清 H1N1 A/Solomon Islands/3/2006 (NIBSC 代码 07/104)、H3N2 A/Wisconsin/67/2005 (NIBSC 代码 05/236)、B B/Malaysia/2506/2004 (NIBSC 代码 05/174)、抗原参考品 H1N1 A/Solomon Islands/3/2006 (IVR-145)/07/102、H3N2 A/Wisconsin/67/2005 NYMC (New York Medical College X-161B/06/120、B B/Malaysia/2506/2004/06/126)。

1.2 方法

1.2.1 疫苗制备 将流感毒种接种于 9~11 日龄鸡胚尿囊腔, 每胚 0.2 mL; 置鸡胚于 35 ℃ 培养 2 d 后, 再于 4 ℃ 冷却过夜; 收获鸡胚尿囊液, 经澄清、浓缩和密度梯度离心制成全病毒悬液, 经甲醛灭活、Triton X-100 和 50% 乙醚裂解全病毒, 裂解的病毒液再次用密度梯度离心法纯化后, 经超滤去除蔗糖, 收集病毒 HA, 经除菌过滤后制成单价原液; 3 个型别的单价原液经检定合格后, 根据中国药典“流感病毒裂解疫苗”标准, 将各型原液进行混合稀释后制成半成品。无菌分装后制成流感病毒裂解疫苗。

1.2.2 HA 含量测定 采用单向免疫扩散法(SRID)。制备抗血清琼脂板, 打孔。将参考抗原及待检样品制成不同稀释度, 加入孔中扩散。经染色、脱色后, 测量沉淀环直径, 将抗原参考品形成的沉淀环直径, 对照 HA 含量作直线回归分析, 求

* 基金项目: 北京协和医学院/中国医学科学院医学生物学研究所国家国际合作项目(2011DFR30420); 云南省自然科学基金资助项目(2004C070M、2006YX29)。 作者简介: 周健, 男, 助理研究员, 主要从事疫苗研究工作。 [△] 通讯作者, E-mail: daizx@imbcams.com.cn。

得回归方程,代入样品沉淀环直径计算出待检品 HA 含量。

1.2.3 卵清蛋白测定 采用 ELISA 法,试剂盒由北京天坛生物制品股份有限公司提供。

1.2.4 其他项目检定 疫苗的其他质量指标:外观检查、pH、游离甲醛、无菌试验、异常毒性、内毒素、总蛋白等项目均按 2010 版《中国药典》三部进行检定^[8]。

1.2.5 稳定性试验 成品稳定性:3 批流感病毒裂解疫苗经(4±2)℃保存 0、3、6、9、12、18 个月,依次测定其 HA 含量及其各项指标。37℃加速稳定性:3 批流感病毒裂解疫苗于(37±2)℃温度条件下放置 7 d 和 14 d,测定 HA 含量及其他各项指标。

表 1 3 批流感病毒裂解疫苗(成人剂型)检定结果

项目	合格标准	疫苗		
		2010301	2010302	2010303
鉴别试验	与相应的型特异性免疫血清进行单向免疫扩散试验,每单(亚)型病毒 HA 应为阳性	合格	合格	合格
物理外观检查	无色至轻微乳白色混悬液,无异物	合格	合格	合格
pH	6.8~8.0	7.2	7.2	7.3
无菌试验	阴性	阴性	阴性	阴性
HA 含量检测(μg/mL)	H1N1 12~18	14.09	14.58	14.33
	H3N2 12~18	16.56	16.44	15.44
	B 12~18	13.58	13.04	13.78
内毒素含量检测(EU/mL)	≤20	≤20	≤20	≤20
总蛋白含量测定(μg/mL)	≤400	182.80	187.50	189.00
卵清蛋白含量(ng/mL)	<500	9.18	8.98	9.39
游离甲醛含量(μg/mL)	<50	<25	<25	<25
抗生素残留量检测(ng/剂)	<50	<0.5	<0.5	<0.5
TritonX-100(μg/mL)	<300	34	35	47
乙醚含量(%)	<0.5	0.004	0.004	0.002
总评	合格	合格	合格	合格

表 2 3 批流感病毒裂解疫苗(成人剂型)加速热稳定 HA 稳定性试验结果

检定项目	合格标准	2010301			2010302			2010303		
		0 d	7 d	14 d	0 d	7 d	14 d	0 d	7 d	14 d
鉴别试验	免疫扩散试验,每单(亚)型病毒 HA 应为阳性	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
物理外观	无色至轻微乳白色混悬液,无异物	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格
pH	6.5~8.0	7.2	7.2	7.2	7.4	7.4	7.4	7.5	7.5	7.5
无菌试验	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
HA 凝素含量(μg/mL)	H1N1 12~18	14.08	13.08	12.98	14.58	12.53	12.54	14.06	12.61	12.61
	H3N2 12~18	16.56	15.29	13.93	16.44	14.03	14.03	15.16	14.49	14.49
	B 12~18	13.58	12.95	12.19	13.04	12.31	12.31	13.59	12.81	12.81
内毒素含量(EU/mL)	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20
总蛋白含量(μg/mL)	≤400	184.00	17.70	164.00	181.0	174.82	158.40	174.70	159.60	151.10
卵清蛋白含量(ng/mL)	<500	9.18	9.10	8.68	8.98	8.89	8.12	9.39	9.2	8.87
游离甲醛含量(μg/mL)	<50	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
抗生素残留量(ng/剂)	<50	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
TritonX-100(μg/mL)	<300	34	35	47	—	—	—	—	—	—
乙醚含量(%)	<0.5	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.002	0.002	0.002
总评	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格

—:无数据。

2 结 果

2.1 3 批流感病毒裂解疫苗检定 成品物理检查均为轻微乳白色液体、无沉淀、无异物、pH 值为 7.2;鉴别试验显示每型血凝素抗原均为阳性;总蛋白含量低于 185~189 mg/mL,其他各项目检查均符合 2010 版《中国药典》标准,见表 1。

2.2 37℃加速稳定性试验结果 3 批流感病毒裂解疫苗于(37±2)℃温度条件下放置 7 d 和 14 d 进行加速稳定性试验,HA 含量 14 d 最高下降值为:H1N1 1.10 g、H3N2 2.62 g、B 1.39 g,HA 含量最终也保持在 12 μg/0.5 mL,平均降幅分别为 12%、16%、8.3%,最高降幅分别为:7.8%、16%、10%。其他项目检查没有明显变化,结果见表 2。

表 3 3 批流感病毒裂解疫苗(成人剂型)4 ℃放置 18 个月稳定性试验结果

检定项目	合格标准	疫苗		
		2010301	2010302	2010303
鉴别试验	与相应的型特异性免疫血清进行单向免疫扩散试验,每单(亚)型病毒 HA 应为阳性。	合格	合格	合格
物理外观检查	无色至轻微乳白色混悬液,无异物	合格	合格	合格
pH	6.8~8.0	7.2	7.2	7.5
无菌试验	阴性	阴性	阴性	阴性
HA 含量检测(μg/mL)	H1N1 12~18	12.29	12.46	12.72
	H3N2 12~18	13.88	13.63	13.04
	B 12~18	12.32	12.47	12.09
内毒素含量检测(EU/mL)	≤20	<20	<20	<20
总蛋白含量测定(μg/mL)	≤400	174.70	181.00	184.00
卵清蛋白含量(ng/mL)	<500	8.53	7.68	8.61
游离甲醛含量(μg/mL)	<50	<25	<25	<25
抗生素残留量检测(ng/剂)	<50	<0.5	<0.5	<0.5
TritonX-100(μg/mL)	<300	34	35	47
乙醚含量(%)	<0.5	0.004	0.004	0.002
总评	合格	合格	合格	合格

表 4 3 批流感病毒裂解疫苗(成人剂型)4 ℃放置 18 个月 HA 稳定性试验结果(μg/0.5 mL)

批号	型别	HA 含量					
		0 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	18 个月
2010301	H1N1	14.085	13.905	13.610	13.075	13.020	12.285
	H3N2	16.560	15.970	15.800	14.695	14.560	13.875
	B	13.580	13.360	13.200	12.660	12.610	12.315
2010302	H1N1	14.575	14.295	14.280	13.595	12.575	12.455
	H3N2	16.440	15.355	15.160	14.520	14.410	13.625
	B	13.040	13.000	12.865	12.985	12.685	12.465
2010303	H1N1	14.060	14.055	13.700	13.095	13.040	12.715
	H3N2	15.155	14.905	14.340	13.895	13.125	13.040
	B	13.59	13.370	13.050	12.905	12.830	12.090

2.3 流感病毒裂解疫苗成品的稳定性 3 批流感病毒裂解疫苗经 4 ℃保存。3、6、9、12、18 个月,经检定蛋白含量有一定降低外,其他指标没有明显变化,均符合 2010 版《中国药典》要求,结果见表 3(仅列出第 18 个月的结果)。将 2009 年生产的 3 批疫苗(批号:2010301、2010302、2010303)经 4 ℃保存 3、6、9、12、18 个月。按时间点到期取样检测 HA 含量。三批疫苗在 4 ℃3~18 个月的保存过程中,其 HA 含量缓慢下降,H1N1 最高下降了 2.12 g,H3N2 最高下降了 2.82 g,B 下降了 1.50 g,平均降幅分别为 12%、16%、8.3%,最高降幅分别为 14%、17%、11%。各型 HA 含量最终均保持在 12 μg/0.5 mL 以上。结果见表 4。稳定性结果表明:3 批疫苗在 4 ℃3~18 个月的保存过程中,其 HA 含量缓慢下降,但不同型别下降幅度不同。18 个月最终 HA 含量均保持在 12 μg/mL 以上,2010303 最低为 12.09 μg/0.5 mL 符合药典标准。

3 讨 论

当前批准使用的流感病毒裂解疫苗主要是通过鸡胚培养流感病毒,灭活裂解病毒后,主要免疫原性组分是通过有机溶剂抽提纯化的 HA,HA 含量至少 12 μg/0.5 mL 才可以通

注射提供足够的刺激免疫反应的抗原。而卵清蛋白是流感疫苗接种后引起过敏反应的主要过敏原,其含量是反映疫苗纯度和安全性的主要指标,严格控制卵清蛋白残留量,是疫苗安全性的重要保证,此外总蛋白含量、内毒素含量、甲醛残留量等也是反映流感疫苗纯度和安全性的重要指标^[9]。笔者将 2009 年研制的 3 批流感病毒裂解疫苗,通过稳定性实验,进行了全面的质量检测,经过 18 个月,均保持在 12 μg/0.5 mL 以上。卵清蛋白远低于 WHO 规定的限度^[10]。疫苗的总蛋白含量等各项指标均低于或符合标准要求。在最终产品中没有添加防腐剂,增加了疫苗的安全性。从试生产的 3 批疫苗 HA 的降幅分析,最大降幅分别为:H1N1 14%、H3N2 17%、B 11%(下降值分别是 2.12、2.82、1.50 μg);加速稳定性试验的最大降幅分别为:H1N1 7.8%、H3N2 16%、B 10%(下降值分别为 1.10、2.62、1.39 μg)。在 3 个型别中,不论是 4 ℃稳定性或 37 ℃加速稳定性实验结果显示,H3N2 的降幅最大,分别为 17%和 16%,这种稳定性差异可能是由于编码 HA 蛋白的 RNA4 节段的核苷酸序列在不同亚型,甚至在同一亚型不同变异株间的差异所造成。由于每年生产用毒株都有所改(下转第 1502 页)

降,证明该方法可以有效地检测酶活。

3 讨 论

腺苷同型半胱氨酸水解酶是一种广泛存在于各种生物中的调节酶类,主要作为 S-腺苷蛋氨酸转甲基作用的抑制剂发挥调节作用。近年来,SAHH 抑制剂作为病毒抑制靶点方面的研究得到了大力的推广和支持。SAHH 抑制剂作为一种新兴的药物设计靶点,各种与之匹配的科研方法还不十分齐备,尤其以 SAHH 酶活测定方法的建立最为重要、快速、准确的测定其活性能为药物筛选提供有力的支持^[9]。

ELLMAN 试剂是在蛋白领域常用的一种显色试剂,显色迅速稳定,本文设计的方法就是基于 ELLMAN 试剂 DTNB 的显色原理,同生成物 Hcy 发生特异显色反应,从而通过显色深浅推断出生成物的多少进而计算酶活。DTNB 显色迅速,加入后即可发生反应,DTNB 的显色不会受到太大环境因素的影响,另外,选择 412 nm 属于可见光区,对实验条件要求不高,普通实验室即可具备此条件^[10]。

酶生物活性的多少由多种因素的影响,反应环境的温度、pH、缓冲环境等都会影响到酶活的测定,因此,选择一个最佳的酶反应环境也至关重要。分别改变不同影响因素做出酶活曲线,从而判断出各个影响因素的最佳反应条件。最佳反应条件的确定可以保证反应的可重复性和准确性,也为后续科研工作提供可借鉴的数据。

综上所述,腺苷同型半胱氨酸水解酶活性测定方法^[11]可以以为抗病毒药物筛选靶点提供有效的依据和可靠的科研数据,可以推进 SAHH 抑制剂在抗病毒药物领域的发展^[12]。

参考文献

[1] 陈昕,王琳. S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶及其抑制剂的研究进展[J]. 中国药物化学杂志,1998,27(1):66-73.
[2] 阮桂芝. 同型半胱氨酸在临床诊治中的价值[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(10):1151-1152.
[3] 纪宇,李振涛,朱奇,等. S-腺苷高半胱氨酸水解酶及其抑制剂的

研究近况[J]. 药学进展,2005,29(11):481-486.

[4] Lozada-Ramirez JD, Martínez-Martínez I, García-Carmona F, et al. Cloning, overexpression, purification, and characterization of S-adenosylhomocysteine hydrolase from *Corynebacterium efficiens* YS-314[J]. Biotechnol Prog, 2008, 24(1):120-127.
[5] Porcelli M, Fusco S, Inizio T, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant S-adenosylhomocysteine hydrolase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*[J]. Protein Expr Purif, 2000, 18(1):27-35.
[6] 张金伟,曾润颖. 南极嗜冷假单胞菌 7197 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶(SAHH) 基因的克隆与序列分析[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(4):5-7.
[7] Nakanishi M, Iwata A, Yatome C, et al. Purification and properties of recombinant *Plasmodium falciparum* S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase[J]. J Biochem, 2001, 129(1):101-105.
[8] Yuan CS, Ault-Riché DB, Borchardt RT. Chemical modification and site-directed mutagenesis of cysteine residues in human placental S-adenosylhomocysteine hydrolase[J]. J Biol Chem, 1996, 271(45):28009-28016.
[9] 何雪梅. S-腺苷同型半胱氨酸水解酶的提纯及应用[D]. 长沙:中南大学,2010.
[10] Khare P, Gupta AK, Gajula PK, et al. Identification of novel S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitors through homology-model-based virtual screening, synthesis, and biological evaluation[J]. J Chem Inf Model, 2012, 52(3):777-791.
[11] Nakanishi M. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase as an attractive target for antimicrobial drugs[J]. Yakugaku Zasshi, 2007, 127(6):977-982.
[12] 付云峰,吴庆莉,杨以阜,等. 以 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶为潜在靶点的新药研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2006, 20(6):510-514.

(收稿日期:2013-03-15)

(上接第 1499 页)

变,其各型毒株 HA 变化也有所不同,在配制疫苗时,为保证疫苗质量,非常有必要确定好半成品 HA 含量的控制范围,对保存的各型别的半成品,在使用时进行 HA 含量的复测,以确保半成品的 HA 含量在控制范围之内。笔者根据稳定性试验结果,将企业内控标准规定在疫苗配制时 HA 含量控制在 33~36 μg/mL,在 2011 年制备的 20110701 等批疫苗,HA 含量分别为:成人剂量型, H1N1 33.04 μg/mL(16.56/0.5 mL); H3N2 35.54 μg/mL(17.77 μg/0.5 mL); B 34.66 μg/mL(17.33 μg/0.5 mL)。该疫苗含有较高的 HA,可提供适宜的抗原量。卵清蛋白和细菌内毒素含量偏低,避免了不良反应的发生,在小鼠的安全性和免疫性的研究与国外疫苗效果基本一致, H1N1、H3N2、B 的保护率达到了 94%、97% 和 70%;各型抗体的 GMT 增加值均在 4 倍以上^[11],为进一步的临床研究提供了依据。

参考文献

[1] WHO. New influenza A/(H1N1) virus; global epidemiological situation[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2009, 84(25):249-257.
[2] 张延龄,张晖. 疫苗学(修订本)[M]. 北京:科学出版社,2006:1171-1185.
[3] 曾祥兴,李康生. 流感百年:20 世纪流感大流行的回顾与启示[J].

医学与社会,2010,23(11):4-6.

[4] Smith NM, Bresee JS, Shay DK, et al. Prevention and control of influenza: recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices(ACIP)[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1999, 48(RR-4):1-42.
[5] Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine[J]. Vaccine, 2003, 21(16):1776-1779.
[6] Wood JM, Dunleavy U, Newman RW, et al. The influence of the host cell on standardization of influenza vaccine potency[J]. Dev Biol Stand, 1999, 98(1):183-188.
[7] 郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 4 版. 北京:中国三峡出版社,1997:16-32.
[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
[9] 邵铭,刘书珍,邱平,等. 2011 年流感疫苗批签发情况总结与质量分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(9):1242-1244.
[10] WHO. Requirements for influenza vaccine, inactivated[J]. TRS, 1991, 8(14):38-52.
[11] 戴宗祥,高菁霞,廖国阳,等. 季节性流行性感冒病毒裂解疫苗在小鼠中的安全性及免疫原性研究[J]. 中国疫苗和免疫, 2012, 18(6):530-533.

(收稿日期:2013-01-09)