

• 基础实验研究论著 •

儿童剂量不含硫柳汞的流感病毒裂解疫苗的制备及其稳定性研究*

戴宗祥,高菁霞,马 磊,郭 晨,周竞贤,姜述德,廖国阳△

(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 探讨儿童剂量不添加防腐剂的流感疫苗制备及其稳定性。方法 将 H1N1、H3N2、B 型流感病毒接种于鸡胚尿囊液中制备儿童剂量的 3 批不含硫柳汞的流感病毒裂解疫苗,进行疫苗的稳定性试验。分别采用单向免疫扩散法(SRID)及酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血凝素及卵清蛋白浓度,并检测疫苗总蛋白浓度、外观、无菌试验、内毒素、游离甲醛及 pH 值等。结果 疫苗 pH 值为 7.2,总蛋白浓度为 182~189 mg/mL。2~8 ℃ 保存 3、6、9、12、18 个月及 (37.0 ± 2.0) ℃ 放置 7、14 d, H1N1、H3N2 及 B 血凝素浓度有所下降,但最终均保持在 6.0 μg/0.25 mL 以上。结论 不添加硫柳汞的流感疫苗稳定性符合《中国药典》(2010 版)标准,提高了疫苗的安全性。

关键词:流感疫苗; 硫柳汞; 血凝素类, 病毒; 稳定性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)09-1100-03

Research on preparation of influenza virus vaccine without thimerosal for children dose and its stability*

Dai Zongxiang, Gao Qingxia, Ma Lei, Guo Chen, Zhou Jingxian, Jiang Shude, Liao Guoyang△

(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 investigate the preparation of influenza virus vaccine without thimerosal for children dose and its stability. **Methods** H1N1, H3N2, B-type influenza virus were inoculated into allantoic fluid to prepare three batches of influenza virus vaccine without thimerosal for children dose and the vaccine stability test was performed. Single radial immunodiffusion(SRID) and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) were used to detect the concentration of hemagglutinin and egg albumin. Total protein concentration, appearance, sterility test, endotoxin, free formaldehyde and the pH value of vaccine were also measured. **Results** The pH value of vaccine was 7.2, with total protein concentration of 182~189 mg/mL. Hemagglutinin concentrations of H1N1, H3N2 and B-type influenza virus decreased when they had been placed in 2~8 ℃ for 3, 6, 9, 12, 18 months or (37.0 ± 2.0) ℃ for 7, 14 days, however, they maintained at 6.0 μg/0.25 mL or more at last. **Conclusion** Influenza virus vaccine without thimerosal for children dose shows improved safety and is accord with the standard of "Chinese Pharmacopoeia"(2010 edition).

Key words: influenza vaccines; thimerosal; hemagglutinins, viral; stability

流行性感冒(流感)主要是由流感病毒引起,而流感病毒的表面抗原易产生变异,是引起世界范围流感大流行的重要原因^[1-4]。由于治疗流感尚无特效药物,接种流感病毒疫苗是预防流感最有效和最经济的措施^[5-7]。H1N1、H3N2、B 型流感病毒是目前引起流感流行的主要病原。因此根据病毒流行情况,每年由 WHO 对下一个年度流感疫苗制备毒株组分提出建议^[8],根据 WHO 的建议,疫苗生产单位选择相同株或相似株生产流感疫苗。血凝素是流感病毒表面的一种糖蛋白,它与流感发生和流行最为密切。血凝素也是一种有效的抗原,是制备疫苗的主要成分^[9]。病毒经培养、灭活、裂解后,提取其有效抗原成分血凝素制成疫苗。因此,研究流感病毒裂解疫苗中血凝素的浓度和稳定性,是保证疫苗质量的关键^[10]。目前世界上广泛应用的是 H1N1、H3N2、B 型流感病毒的三价流感病毒裂解疫苗。为了保证疫苗的质量,在制备疫苗时需添加防腐剂,然而美国疾病预防控制中心的资料显示,接种不含防腐剂硫柳汞的疫苗,患者局部出现红肿的概率更小,对儿童更安全。因此,近年来包括美国儿科学会在内的多个学术组织,呼吁在疫

苗中应尽量减少或不添加硫柳汞。为了制备更加安全有效的儿童用疫苗,笔者将 3 批不添加硫柳汞的儿童剂量流感病毒裂解疫苗放置于不同温度,并保存不同时间,定期取样检测疫苗的稳定性,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 流感毒株 采用世界卫生组织 2007~2008 年建议北半球地区使用的流感毒株: H1N1 A/Solomon Islands/3/2006 IVR-145、H3N2 A/Wisconsin/67/2005 NYMCX-161B 及 B B/Malaysia/2506/2004。

1.2 检测用抗原抗体 采用英国生物制品标准和检定研究所的标准抗血清: H1N1 A/Solomon Islands/3/2006 (NIBSC code 07/104)、H3N2 A/Wisconsin/67/2005 (NIBSC code 05/236)、B B/Malaysia/2506/2004 (NIBSC code 05/174)。标准抗原: H1N1 A/Solomon Islands/3/2006 (IVR-145)/07/102、H3N2 A/Wisconsin/67/2005 NYMC X-161B/06/120 及 B B/Malaysia/2506/2004/06/126。

1.3 疫苗制备 将不同型别的 3 种流感毒种 H1N1、H3N2、B

* 基金项目:国家国际合作资助项目(2011DFR30420);云南省自然科学基金资助项目(2010CD134)。 作者简介:戴宗祥,男,副研究员,主要从事疫苗研究工作。 △ 通讯作者, E-mail: Liaogy@imcams.com.cn。

接种于 10~11 日龄的鸡胚尿囊液中, 每个鸡胚 0.2 mL; 于 35 ℃ 培养 2 d 后, 4 ℃ 过夜收取鸡胚尿囊液, 经过滤澄清、超滤浓缩、蔗糖密度梯度离心纯化, 制成全病毒悬液, 用甲醛灭活病毒; 再次用密度梯度法纯化裂解的病毒液, 超滤法除蔗糖, 收集病毒血凝素, 过滤除菌后制成单价原液; 单价原液经检定合格后, 依据《中国药典》(2010 版)“流感病毒裂解疫苗”标准, 根据各型原液的浓度进行稀释、配比混合制成半成品, 不添加任何防腐剂, 无菌分装后制备流感病毒裂解疫苗。本研究采用 2010 年制备的 3 批儿童剂量的流感疫苗进行研究, 疫苗批次分别为: 20100401、20100402、20100403。

1.4 稳定性试验 2~8 ℃ 保存试验: 3 批不含硫柳汞的儿童剂量流感病毒裂解疫苗于 2~8 ℃ 条件下保存 0、3、6、9、12、18 个月, 取样检测血凝素浓度及其他项目。37 ℃ 加速稳定性试验: 3 批不含硫柳汞的儿童剂量流感病毒裂解疫苗于 (37.0 ± 2.0) ℃ 条件下, 放置 7、14 d, 取样检测血凝素浓度及其他项目。

1.5 血凝素及卵清蛋白浓度的测定 分别采用单向免疫扩散法 (single radial immunodiffusion, SRID) 及酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血凝素及卵清蛋白浓度。

1.6 疫苗质量的检测 疫苗总蛋白浓度、外观、无菌试验、内毒素、游离甲醛、pH 值等项目均按《中国药典》(2010 版) 进行检测。

2 结 果

2.1 疫苗的成品检查 外观检查 3 批不含硫柳汞的儿童剂量

流感病毒裂解疫苗为浅乳白色液体, 无异物和沉淀, pH 值为 7.2; 鉴别试验显示, 每个病毒型别的血凝素抗原均呈阳性, 血凝素为 7.04~9.23 mg/支, 0.25 mL/支, 总蛋白浓度为 182~189 mg/mL, 其余各项目的检查均符合《中国药典》(2010 版)。

2.2 2~8 ℃ 疫苗稳定性 3 批不含硫柳汞的儿童剂量流感病毒裂解疫苗经 2~8 ℃ 保存 3、6、9、12、18 个月, 蛋白浓度(总蛋白和卵清蛋白浓度)有一定降低, 其他指标, 如抗菌药残留量、游离甲醛、Triton X-100 和乙醚浓度等没有明显变化, 符合《中国药典》(2010 版) 标准要求。

2.3 血凝素浓度的变化 3 批不含硫柳汞的儿童剂量流感病毒裂解疫苗经 2~8 ℃ 保存, 按 3、6、9、12、18 个月时间点取样检测血凝素浓度, 3 批不含硫柳汞的儿童剂量流感病毒裂解疫苗在 18 个月的保存过程中, 血凝素浓度缓慢下降, H1N1、H3N2 及 B 血凝素浓度下降的最大幅度分别为 1.06、1.41 及 0.75 g; 下降的平均百分比分别为 12.31%、15.88%、8.30%, 最高分别达 14.54%、17.15% 及 11.03%。各型血凝素浓度最终均保持在 6.0 μg/0.25 mL 以上。

2.4 加速稳定性试验结果 3 批不含硫柳汞的儿童剂量流感病毒裂解疫苗于 (37.0 ± 2.0) ℃ 条件下放置 7、14 d 进行加速稳定性试验, H1N1、H3N2 及 B 血凝素浓度在第 14 天的最高下降值分别为 1.02、1.31、0.69 g, 下降的平均百分比分别为 10.72%、11.79%、7.60%, 最高分别达 13.99%、15.82%、10.16%, 血凝素浓度最终也保持在 6.0 μg/0.25 mL 以上, 其他项目检查没有明显变化, 见表 1。

表 1 3 批不含硫柳汞的儿童剂量流感病毒裂解疫苗的加速稳定性试验结果

批次	pH	无菌试验	血凝素浓度(μg/0.25 mL)			内毒素浓度(EU/mL)	总蛋白浓度(μg/mL)	卵清蛋白浓度(ng/mL)
			H1N1	H3N2	B			
20100401								
0 d	7.2	阴性	7.04	8.28	6.79	≤20	184.00	8.89
7 d	7.2	阴性	6.54	7.65	6.48	≤20	17.70	8.72
14 d	7.2	阴性	6.49	6.97	6.10	≤20	164.00	8.46
20100402								
0 d	7.4	阴性	7.29	8.22	6.52	≤20	181.00	9.23
7 d	7.4	阴性	6.72	7.67	6.36	≤20	174.82	8.83
14 d	7.4	阴性	6.27	7.02	6.14	≤20	158.40	8.67
20100403								
0 d	7.5	阴性	7.13	7.58	6.80	≤20	174.70	9.12
7 d	7.5	阴性	6.58	7.25	6.55	≤20	159.60	8.93
14 d	7.5	阴性	6.31	6.65	6.14	≤20	151.10	8.65

3 讨 论

目前流感病毒裂解疫苗主要是通过鸡胚大规模培养流感病毒而制备。灭活裂解病毒后, 其主要免疫性组分是经有机溶剂抽提纯化的血凝素。儿童剂量的疫苗每支需至少含有 6.0 μg 血凝素(每支 0.25 mL), 机体才可以通过注射抗原后, 产生有效的免疫反应。而鸡胚卵清蛋白是流感疫苗接种后引起人体过敏反应的主要过敏原, 卵清蛋白浓度是反映疫苗纯度和安全性的主要指标, 因此, 在流感疫苗的制备工艺中, 要严格控制卵清蛋白残留量, 这是疫苗安全性的重要保证。此外, 内

毒素浓度、总蛋白浓度等也是反映疫苗安全性和纯度的重要指标^[11~12]。笔者所在单位 2010 年研制了 3 批不含硫柳汞的儿童剂量流感病毒裂解疫苗。在稳定性实验前后, 对疫苗进行了全面质量检测, 经过 18 个月监测, 血凝素浓度缓慢下降, 但是均保持在标准要求的最低下限值 6.0 μg/0.25 mL 以上。卵清蛋白远低于《世界卫生组织生物制品规程》和《中国药典》(2010 版) 规定的限度。疫苗的总蛋白浓度等指标均低于或符合标准要求。

美国疾病预防控制中心的资料显示, 接种不含硫柳汞的疫

苗,患者局部出现红肿的概率更小,对儿童更安全。1999年美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration,FDA)及欧洲药品评价局(European Medicines Evaluation Agency,EMEA)为使疫苗更为安全,要求疫苗生产停止使用硫柳汞。在最终产品中不添加防腐剂。通过试生产的3批不含硫柳汞的儿童剂量流感病毒裂解疫苗的保存结果分析,H1N1、H3N2及B血凝素浓度下降的最大幅度分别为14.54%、17.15%及11.03%(下降值分别为1.06、1.41及0.75 g);加速稳定性试验显示,H1N1、H3N2及B血凝素浓度的最大降幅分别为13.99%、15.82%、10.16%(下降值分别为1.02、1.31、0.69 g)。为确保疫苗质量,对保存的各型别半成品在使用时有必要进行血凝素浓度的检测,以确保半成品的血凝素浓度在控制范围内。笔者所在单位根据稳定性试验结果,在配制儿童剂量疫苗时,将血凝素浓度的企业内控标准规定为33~36 μ g/mL。在2011年制备的儿童剂量流感疫苗中含有较高的血凝素,提供了足够的抗原量,保证了疫苗的有效性;在疫苗制备过程中不添加防腐剂,降低了不良反应的发生。动物实验显示其安全性和免疫性与国外疫苗效果基本一致,免疫后H1N1、H3N2和B型抗体阳性率(抗体滴度不小于1:40)分别达94%、97%和70%;各型抗体的几何平均滴度(geometric mean titer,GMT)增加值均超过4倍以上,H1N1、H3N2和B分别为30、24、8倍,具有良好的安全性和免疫性^[13],为制备不含防腐剂、安全、有效的流感病毒裂解疫苗的研究及应用提供了依据。

参考文献

- [1] New influenza A (H1N1) virus: global epidemiological situation, June 2009[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2009, 84(25): 249-257.
- [2] World Health Organization. New influenza A (H1N1) virus: global epidemiological situation, June 2009[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2009, 84(25): 249-257.

(上接第1099页)

而在转录水平上调控基因的表达^[6]。miRNA能通过调控其下游靶基因的表达而参与调控细胞的凋亡、增殖以及分化等^[12]。

本研究根据Target Scan 6.2软件,在1 255~1 261 bp位置预测到一个在不同种属中高度保守的miR-200b、miR-200c和miR-429结合位点,并且通过分子克隆及荧光素报告系统,确定miR-200b、miR-200c和miR-429能靶向负性调控XIAP-3'UTR。今后,仍需进一步通过蛋白质印迹技术检测miRNA对XIAP蛋白表达水平的影响,从而确定调控XIAP表达的miRNA。总之,本研究为寻找可能调控XIAP基因表达的miRNA奠定了实验基础,并为提高化疗药物敏感性提供了新的思路。

参考文献

- [1] Wong HH, Lemoine NR. Pancreatic Cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009, 6(7): 412-422.
- [2] Fulda S. Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic Cancer[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(7): 1221-1227.
- [3] Lacasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, et al. IAP-targeted therapies for Cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(48): 6252-6275.
- [4] Hunter AM, Lacasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as Cancer targets[J]. Apoptosis, 2007, 12(9): 1543-1568.

- [3] 赵凯,章以和,李河民,等.医学生物制品学[M],2版.北京:人民卫生出版社,2007.
- [4] 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.
- [5] Fiore AE, Shay DK, Broder K, et al. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008[J]. MMWR Recomm Rep, 2008, 57 (RR-7): 1-60.
- [6] Hanquet G, Van Damme P, Brasseur D, et al. Lessons learnt from pandemic A(H1N1) 2009 influenza vaccination. Highlights of a European workshop in Brussels (22 March 2010)[J]. Vaccine, 2011, 29(3): 370-377.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, 2013-2014[J]. MMWR Recomm Rep, 2013, 62(RR-07): 1-43.
- [8] Gerding C. The annual production cycle for influenza vaccine[J]. Vaccine, 2003, 21(16): 1776-1779.
- [9] Wood JM, Dunleavy U, Newman RW, et al. The influence of the host cell on standardisation of influenza vaccine potency[J]. Dev Biol Stand, 1999, 98(1): 183-188.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 张延龄,张晖.疫苗学[M].北京:科学出版社,2006: 1171-1185.
- [13] 戴宗祥,王湘宜,王俊,等.流感病毒裂解疫苗儿童剂型在小鼠中的安全性及免疫原性研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(15): 1793-1794.

(收稿日期:2014-01-11)

- [5] Krepelea E, Dankova P, Moravcikova E, et al. Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma[J]. Int J Oncol, 2009, 35(6): 1449-1462.
- [6] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [7] Mourtada-Maarabouni M, Watson D, Munir M, et al. Apoptosis suppression by candidate oncogene PLAC8 is reversed in other cell types[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(1): 80-91.
- [8] Dufournet C, Uzan C, Fauvet R, et al. Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis [J]. J Reprod Immunol, 2006, 70(1/2): 151-162.
- [9] Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family[J]. EMBO Rep, 2006, 7(10): 988-994.
- [10] Banerjee S, Azmi AS, Padhye S, et al. Structure-activity studies on therapeutic potential of Thymoquinone analogs in pancreatic Cancer[J]. Pharm Res, 2010, 27(6): 1146-1158.
- [11] Li C, Yang Z, Zhai C, et al. Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor alpha by inhibiting NF- κ B signaling pathway[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 73.
- [12] Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer[J]. Annu Rev Med, 2009, 60: 167-179.

(收稿日期:2013-12-15)