

四价流感病毒裂解灭活疫苗的研制

吴建华, 路福平, 赵越, 王剑飞, 帅旗, 张贇, 朱实惠, 缪小翠, 赵静, 付建林

【摘要】 目的 研制四价流感疫苗, 提高疫苗对人群的保护能力。方法 用 WHO 推荐的流感疫苗株采用先区带离心再分子筛层析纯化的工艺制备流感疫苗, 按中国药典(2010 年版 三部)的要求进行全项检定, 并进行免疫原性试验和动物过敏性试验。结果 各项指标均符合《中国药典》2010 年版三部《流感病毒裂解疫苗》项下申报注册标准。免疫原性试验结果表明在现有三价流感疫苗中增加一个 B 型病毒抗原后, 新增抗原与原有抗原无拮抗作用, 不影响相关抗体的产生。过敏性试验表明抗原种类和总量的增加, 不会加重局部和全身的副作用反应。结论 本生产工艺成熟、稳定、可靠, 可制备高质量适合人用的安全、有效的流感疫苗。

【关键词】 流感疫苗; 免疫原性; 工艺优化; 安全性

The research and development of quadrivalent influenza vaccine (split virion), inactivated Wu Jianhua*, Lu Fuping, Zhao Yue, Wang Jianfei, Shuai Qi, Zhang Yun, Zhu Shihui, Miao Xiaocui, Zhao Jing, Fu Jianlin. * College of biological engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China

Corresponding author: Wu Jianhua, Email: tywwwjh@163.com

【Abstract】 Objective To research and development of quadrivalent influenza vaccine, improve the ability of the vaccine to protect people. **Methods** Using the influenza vaccine strains recommended by WHO, adopt zone centrifugation and molecular sieve chromatography purification process to produce influenza vaccines and verify the vaccine in accordance with the requirements of Chinese Pharmacopoeia (2010 Edition 3), and then continue to test the immunogenicity and animal allergy reaction. **Results** The indicators are in line with the "China Pharmacopoeia 2010 three edition" influenza vaccine (split virion) under the registration standard. Immunogenicity test results show that adding a B virus antigen in the trivalent influenza vaccine, the new increased antigen and original antigen have no antagonistic effect and does not affect the related antibody; allergen test showed that the increase in antigen kinds and amounts does not aggravate the local and systemic adverse reactions. **Conclusions** This production technology is mature, stable and reliable, and can produce high quality suitable for people with safe and effective vaccine.

【Key words】 Influenza vaccine; Immunogenicity; Process optimization; Safety

流行性感胃是影响人类身体健康和生命安全的重大传染性疾病, 接种流感疫苗则是目前预防和控制流感流行、降低流感所造成的疾病负担最重要和最有效的手段^[1-3]。目前在国内上市的三价流感疫苗只含有一个 B 型(Yamagata 系或者 Victoria 系), 由于 B 型病毒 Yamagata 系和 Victoria 系之间的交叉保护很低^[4,5], 多年的流行病学调查证实, 这种疫苗

对部分接种人群没有保护效果^[6]。本研究在目前三价组分的基础上, 通过优化生产工艺, 制备同时包括 B 型两系流感病毒研制出新的四价流感病毒裂解灭活疫苗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 流感疫苗株: 甲 1 (A/California/7/2009, H1N1)、甲 3 (A/Perth/16/2009, H3N2)、乙 I 型 (B/Brisbane/60/2008, B/Victoria) 和乙 II 型 (B/Florida/4/2006, B/Yamagata 系) 四株流感病毒毒株均为 WHO 推荐疫苗株, 从英国国家生物标准与控制研究所 (NIBSC) 引进。

1.1.2 主要试剂及仪器: 甲 1 (H1N1)、甲 3 (H3N2)、

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2015.05.002

基金项目: 重大新药创制科技重大专项项目 (2014ZX09304315002)

作者单位: 300222 天津科技大学生物工程学院 (吴建华、路福平); 江苏金迪克生物技术有限公司 (赵越、王剑飞、帅旗、张贇、朱实惠、缪小翠、赵静、付建林)

通信作者: 吴建华, Email: tywwwjh@163.com

乙 I 型 (B/Victoria) 和乙 II 型 (B/Yamagata) 流感病毒标准抗原参考品、标准抗体参考品均来源于 NIBSC; 蔗糖, 购自德国默克公司; 碳酸氢钠、氯化钠, 购自河北华晨药业有限公司; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠, 购自成都华邑药用辅料制造有限责任公司; 超高速离心机, 购自美国 Beckman 公司, 型号为 OP-L90K; 层析柱, 购自美国 GE 公司, 型号为 BPG10/100; 超滤系统, 购自美国 Millipore 公司, 型号为 P2C100C05; 酶标仪, 购自美国 Bio-Rad 公司, 型号为 MODEL680。

1.2 方法

1.2.1 优化疫苗生产工艺: 对流感单价原液中全病毒的纯化生产工艺进行了优化, 将传统的单一的分子筛层析法或区带离心纯化法改为先区带离心纯化再分子筛层析纯化两步纯化。

1.2.2 电镜观察: 将样品滴一滴至喷有碳支持膜的载网上, 1 min 后用滤纸于载网边缘处吸去多余液体, 立即滴加 3% 磷钨酸溶液, 染色 30 s; 用滤纸吸干, 样品干燥后进行透射电镜观察。

1.2.3 SDS-PAGE 电泳: 将四个流感病毒疫苗原液按照糖苷酶 PNGase F 说明书处理, 即 36 μ l 样品中加入 10 \times 糖蛋白变性缓冲液 (Glycoprotein Denaturing Buffer) 4 μ l, 混匀, 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 进行还原处理, 冷却至室温后, 加入 10 \times G7 反应缓冲液 (Reaction Buffer) 5 μ l, 10% NP-40 5 μ l, 按 1:100 体积比加入糖苷酶 PNGase F 0.5 μ l, 37 $^{\circ}$ C 处理 18 h。样品经处理后加入 17 μ l 4 \times 蛋白电泳上样缓冲液。同时以未经酶切处理的疫苗原液作为对照。

1.2.4 疫苗的全面检定: 根据《中国药典》2010 年版三部《流感病毒裂解疫苗》项下标准及企业申报的注册标准对制品进行全面检定。

1.2.5 免疫原性试验: 将三价和四价流感病毒裂解疫苗分别稀释, 使其每 0.1 ml 中含每株流感病毒抗原分别为 5.5 μ g、4.5 μ g 和 3.7 μ g 的三种不同浓度。试验动物: KM 小鼠, 18~22 g, 购自中国医学科学院, 随机分组, 每组 10~20 只, 并设 PBS 对照组。免疫方法: 每只小鼠经后腿肌肉注射, 注射量为 0.10 ml。免疫 21 d 后, 由小鼠眼眶采血, 并分离血清。每份血清经霍乱滤液处理, 进行血凝抑制试验, 测定其抗体。血凝抑制试验使用标准抗原及标准血清均来自 NIBSC, 确定和配制血凝抑制试验中所使用的四个血凝单位的抗原浓度。

免疫原性的判定: 抗体滴度是采用血凝抑制法

(HI) 测定血清中对所有的原型病毒株的抗血凝素抗体。同时设有阳性和阴性血清的参考标准。

结果分析和统计: 每份血清做二次滴定, 同时滴定免前和免后的血清。每份血清样本的滴度是二次单独测定的几何平均滴度。为便于计算, 任何 HI < 10 表示为 5。血凝抑制试验中抗体阳转的判定是免前血清阴性者其免后血清抗体滴度 ≥ 40 或血清抗体滴度显著增高至少四倍以上。

统计指标参数: 免前血清中的抗血凝素抗体几何平均滴度, 抗体几何平均滴度的增加和血清阳转数。

1.2.6 过敏反应试验: 试验组每只动物每次注射 0.25 ml 含有每株流感抗原各 30 μ g 共 120 μ g。对照组注射 0.25 ml 生理盐水作为阴性对照, 注射 0.25 ml 浓度为 2 mg/ml 的 BSA 作为阳性对照, 每组动物均为 6 只隔日腹腔注射, 共 3 次。分别在首次注射后第 14 天和 21 天各取 3 只进行过敏实验, 试验组每只动物静脉注射 1 ml 含每株 30 μ g 共 120 μ g 的流感病毒抗原, 阴性对照组每只动物静脉注射 1 ml 生理盐水, 阳性对照组每只动物静脉注射 1 ml 浓度为 2 mg/ml 的 BSA, 观察试验动物是否出现过敏反应。

2 结果

2.1 生产工艺优化 用流感 B 型 Victoria 系病毒采用单一的区带离心法、单一的分子筛层析纯化和先区带离心纯化再分子筛层析两步纯化法三种不同的纯化工艺对流感病毒的抗原回收率和杂蛋白去除效果进行比较, 三种工艺的抗原回收率依次为 83.24%、80.87% 和 82.14%, 杂蛋白去除率依次为 81.92%、83.69% 和 99.54%。从以上结果可知, 三种不同的纯化工艺对流感病毒的抗原回收率基本没有影响, 对杂蛋白去除效果两步纯化法明显优于一步纯化法, 因此通过工艺优化, 可得到高纯度的全病毒, 有利于后期的病毒裂解和抗原纯化。

2.2 电镜观察结果 流感病毒裂解疫苗和全病毒疫苗相比具有良好的耐受性, 较低的副反应, 可以用于儿童、成人和老年人, 而裂解的效果直接影响疫苗的品质, 从图 1 可见: 流感全病毒疫苗电镜下病毒颗粒形态为圆形、椭圆形, 有包膜, 包膜外放射状排列纤突。流感病毒裂解疫苗样品电镜下无成形的病毒样颗粒, 囊膜破, 可见不同形态的核衣壳结构。流感病毒裂解疫苗样品的电镜观察表明现行生产工艺能

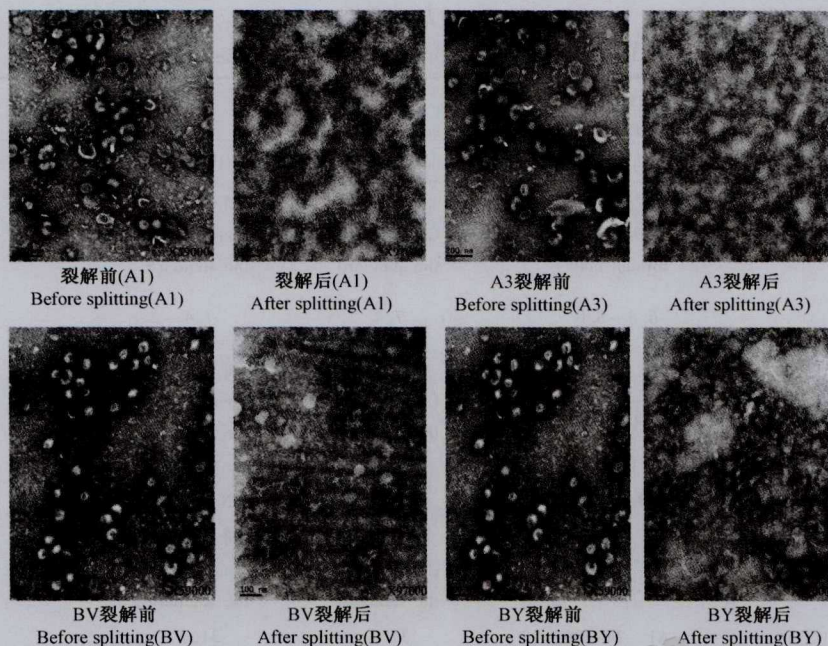


图 1 流感病毒裂解前后电镜图

Fig. 1 Electron microscope before and after splitting of influenza virus

使疫苗中的病毒裂解完全。

2.3 SDS-PAGE 结果 纯化后的流感单价原液经糖苷酶 PNGase F 处理后进行 SDS-PAGE 电泳,可见 NP、HA1、糖苷酶、M、HA2 条带,结果与邵铭^[7]等《流感疫苗血凝素含量测定替代方法的建立及验证》一致。未经糖苷酶 PNGase F 处理进行 SDS-PAGE 电泳则无法清晰区分各条带,结果见图 2。杂蛋白经糖苷酶 PNGase F 处理后图像不会发生改变,但图中未见有明显的其它杂蛋白带,结果证实使用优化后工艺获得的是高纯度的流感病毒颗粒。



图 2 流感单价原液 SDS-PAGE 电泳结果图

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis result of influenza monovalent solution

面检定,检定结果见表 1。

2.5 免疫原性试验结果 为考查制备的四价流感裂解疫苗的免疫效果进行了免疫原性试验,并以三价流感裂解疫苗为对照疫苗同时进行,三价、四价流感裂解疫苗免疫原性试验结果比较见表 2。

从表 2 可以看出,所有实验组的每个动物都对所注射的相应抗原产生不同滴度的抗体。PBS 组无任何抗体产生。在三价或四价流感裂解疫苗实验中的小鼠对 B/B 型病毒抗原,其免疫反应明显低于 A1、A3 和 B/F 抗原组。比较在三价和四价流感病毒 B/B 型病毒抗原所产生的抗体并无明显差异。说明增加 B/F 流感抗原后除了自身产生近似 A1 和 A3 流感抗原产生的抗体水平外,没有对 B/B 型病毒抗原所产生的抗体有明显影响,结果与 Cioppa, G D. 2011 年报道相似^[8],同时试验动物用三种不同浓度抗原免疫后其抗体滴度并未显示出随抗原剂量的增加而增加。

2.6 注射给药全身过敏反应试验结果 BSA 阳性对照组 3 只豚鼠在致敏后第 14 天攻击后均出现连续、多次的咳嗽、伴有明显的呼吸困难或痉挛等过敏症状,其中有 2 只出现典型过敏症状后死亡。BSA 阳性对照组 3 只豚鼠在致敏后第 21 天攻击后均出现连续、多次的咳嗽、伴有明显的呼吸困难或痉挛等过敏症状,其中有 1 只出现典型过敏症状后死亡,而

2.4 疫苗的检定结果 根据《中国药典》2010 年版三部《流感病毒裂解疫苗》项下标准对制品进行全

表 1 三批成品疫苗检定结果

Tab. 1 The three batches of finished product vaccine test results

检定项目 Identification items	中国药典标准 Chinese Pharmacopoeia standards	检定结果 Test Results		
		20110601	20110602	20110603
外观 Appearance	微乳白色无异物 Micro ivory no foreign body	符合规定 Comply with the standard	符合规定 Comply with the standard	符合规定 Comply with the standard
pH 值 pH-value	6.8 ~ 8.0	7.4	7.4	7.4
装量 Loading capacity	≥0.5 ml/支 ≥0.5 ml/bottle	符合规定 Comply with the standard	符合规定 Comply with the standard	符合规定 Comply with the standard
无菌检查 Sterility test	阴性 Negative	阴性 Negative	阴性 Negative	阴性 Negative
异常毒性 Abnormal toxicity	健存, 体重增加 Woods, weight gain	符合规定 Comply with the standard	符合规定 Comply with the standard	符合规定 Comply with the standard
血凝素含量 HA content (μg/ml)	A1 24 ~ 36	31.2	31.2	31.2
	A3 24 ~ 36	32.9	32.9	32.9
	B1 24 ~ 36	31.0	31.0	31.0
	B2 24 ~ 36	31.2	31.2	31.2
鉴别试验 Identity test	阳性 Positive	阳性 Positive	阳性 Positive	阳性 Positive
甲醛残留量 Formaldehyde residue (μg/ml)	<25	1.55	1.69	1.74
总蛋白含量 Total protein content (μg/ml)	<400	192.70	189.60	187.50
卵清蛋白残留量 Ovalbumin residue (ng/ml)	<200	8.3	8.39	8.33
细菌内毒素 Bacterial endotoxins (EU/ml)	<20	<1.0	<1.0	<1.0

表 2 三价、四价流感裂解疫苗免疫原性试验结果比较

Tab. 2 Comparison of Immunogenicity test results for trivalent, quadrivalent influenza vaccine (split virion)

抗原量 Amount of antigen (μg)	三价疫苗抗体 (GMT) Ab of trivalent vaccine			四价疫苗抗体 (GMT) Ab of quadrivalent vaccine		
每株 Per strain	3.7	4.5	5.5	3.7	4.5	5.5
总抗原 Total antigen	11.1	13.5	17.5	14.8	18	22
A1	98.49 ± 80(10)	113.96 ± 92(10)	129.96 ± 72(10)	125.53 ± 93(20)	139.28 ± 105(10)	144.20 ± 109(20)
A3	113.14 ± 76(10)	126.99 ± 88(10)	121.26 ± 74(10)	134.54 ± 81(20)	171.48 ± 89(10)	154.55 ± 81(20)
B/B	28.28 ± 19(10)	22.45 ± 11(10)	32.49 ± 23(10)	36.05 ± 22(20)	20.00 ± 10(10)	29.28 ± 19(20)
B/F	—	—	—	154.55 ± 90(20)	196.98 ± 88(10)	190.27 ± 85(20)
PBS	0(6)	0(6)	0(6)	0(6)	0(6)	0(6)

GMT: Geometric Mean Titre 几何平均滴度; (N): Number 为动物数

试验组和阴性对照组所有豚鼠在致敏后第 14 天和致敏后第 21 天攻击后,均未出现任何异常反应,说明新研制的四价流感病毒裂解疫苗在动物试验中没有过敏反应的发生。

3 讨论

历史记载每个世纪平均发生 2~4 次流感大流行。20 世纪发生了 4 次,有 3 次起源于中国。因此,我国一直被认为是一个流感大国。在目前三价流感疫苗组分的基础上,增加另外一个谱系的 B 型病毒制备包括 B 型两系流感病毒的四价流感疫苗,是科学界和生物制品界认识和积极建议的结果,无疑会提高目前流感疫苗株推荐的准确性,扩大覆盖异型株^[9-11],提高目前流感疫苗株推荐的准确性和免疫保护效果。

本研究的结果显示通过工艺优化,可以在基本不影响抗原回收率的基础上更好的去除杂蛋白,在推荐的三价疫苗的基础抗原上再增加一份另一谱系的 B 型流感抗原,随抗原种类和总量增加,在以小鼠为模型的免疫原性试验结果表明新增加的抗原与原有抗原无拮抗作用,不会影响相关抗体的产生;过敏原性试验表明由于抗原种类和总量的增加,不会加重局部和全身的副作用反应。本产品已于 2013 年 6 月获得 CFDA 临床试验批件,并于 2015 年 3 月完成 I 期临床试验,已证实疫苗的安全性。

4 参考文献

- [1] Luke CJ, Subbarao K. Vaccines for pandemic influenza. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12:66-72.
- [2] 柴文清, 鲁芳, 陈翠花, 等. 2005 年和 2006 年流感病毒裂解疫苗接种人体后的反应及免疫效果. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21:139-142.
- [3] 庄茂欣, 潘红星, 姚根红, 等. 国产甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗的安全性及免疫原性. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23:67-70.
- [4] Levandowski RA, Regnery HL, Staton E, et al. Antibody responses to influenza B viruses in immunologically unprimed children. *Pediatrics*, 1991, 88:1031-1036.
- [5] Rota PA, Hemphill ML, Whistler T, et al. Antigenic and genetic characterization of the haemagglutinins of recent cocirculating strains of influenza B virus. *J Gen Virol*, 1992, 73:2737-2742.
- [6] 吴建华, 赵越. 四价流感疫苗预防季节性流感的研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2013, 27:319-321.
- [7] 邵铭, 李娟, 宋颖丽, 等. 流感疫苗血凝素含量测定替代方法的建立及验证. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23:770-773.
- [8] Cioppa DG, Vesikari T, Sokal E, et al. Trivalent and quadrivalent MF59[®]-adjuvanted influenza vaccine in young children: a dose- and schedule-finding study. *Vaccine*, 2011, 29:8696-8704.
- [9] Banzhoff A, Gasparini R, Laghi-Pasini F, et al. MF59-adjuvanted H5N1 vaccine induces immunologic memory and heterotypic antibody responses in non-elderly and elderly adults. *PLoS One*, 2009, 4:4384.
- [10] Leroux-Roels I, Borkowski A, Vanwollegem T, et al. Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2007, 370:580-589.
- [11] Stephenson I, Nicholson KG, Hoschler K, et al. Antigenically distinct MF59-adjuvanted vaccine to boost immunity to H5N1. *N Engl J Med*, 2008, 359:1631-1633.

(收稿日期:2015-05-26)



知网查重限时 **7折** 最高可优惠 **120元**

本科定稿，硕博定稿，查重结果与学校一致

立即检测

免费论文查重: <http://www.paperyy.com>

3亿免费文献下载: <http://www.ixueshu.com>

超值论文自动降重: http://www.paperyy.com/reduce_repetition

PPT免费模版下载: <http://ppt.ixueshu.com>
