

四价流感病毒裂解疫苗的稳定性

蒋正东 李振辉 陈科 帅旗 李岳勇 赵越 吴建华 王斐 赵静 余军
江苏金迪克生物技术有限公司 江苏 泰州 225300

摘要: 目的 评价四价流感病毒裂解疫苗的稳定性,为疫苗的有效期提供依据。方法 分别将 A1(H1N1)、A3(H3N2)、B/Victoria 和 B/Yamagata 等 4 株毒株制备单价原液,生产 6 批疫苗(不含硫柳汞),评价疫苗分别在(37±2)℃、(25±2)℃和(6±2)℃条件下的稳定性。结果 四价流感病毒裂解疫苗在(37±2)℃保存 10 d、在(25±2)℃保存 3 个月、在(6±2)℃保存 15 个月,疫苗各项指标均符合企业注册标准和《中华人民共和国药典》2015 版(三部)的要求。结论 四价流感病毒裂解疫苗具有良好的稳定性,在(6±2)℃可稳定保存 15 个月。

关键词: 四价流感病毒裂解疫苗; 硫柳汞; 稳定性; 评价

中图分类号: R373.1⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1005-5673(2017)05-0016-05

DOI: 10.13309/j.cnki.pmi.2017.05.003

Stability for quadrivalent influenza virus split vaccine

JIANG Zheng-dong, LI Zhen-hui, CHEN Ke, SHUAI Qi, LI Yue-yong, ZHAO Yue, WU Jian-hua,
WANG Fei, ZHAO Jing, YU Jun

Jiangsu GDK Biological Technology Co., LTD., Taizhou 225300, Jiangsu Province, China

Corresponding author: JIANG Zheng-dong, E-mail: jiangzhengdong@gdkbio.com

Abstract: Objective To evaluate the stability of quadrivalent influenza virus split vaccine (QIV), in order to provide the basis for the validity of QIV products. **Methods** Each of monovalent stock solution was prepared from four strains of A1(H1N1), A3(H3N2), B/Victoria and B/Yamagata, separately, from which 6 batches of QIVs were produced. QIV products (thimerosal-free) were placed at (37±2)℃, (25±2)℃ and (6±2)℃, respectively, to evaluate the stability for QIV products. **Results** The indexes of the vaccine were in accordance with the enterprise registration standard and the requirements of《Pharmacopoeia of the People's Republic of China》(2015) Volume III, after QIV products were stored at (37±2)℃ for 10 days, (25±2)℃ for 3 months, (6±2)℃ for 15 months. **Conclusion** The QIV has a good stability, and could be stored at (6±2)℃ for 15 months.

Key words: Quadrivalent influenza virus split vaccine(QIV); Thimerosal; Stability; Evaluation

国内已上市的三价流感病毒裂解疫苗含 2 种 A 型和 1 种 B 型毒株,而目前 B 型流行株有 2 个系(Yamagata 系和 Victoria 系),由于 2 种 B 型病毒之间的交叉保护作用很弱,含一种 B 型的三价流感病毒裂解疫苗对另外一个谱系感染的人群保护效果有限^[1]。为解决三价流感病毒裂解疫苗保护率不足的问题,国内外各流感疫苗生产企业均在积极研制四价流感病毒裂解疫苗。目前,国际上有 2 家疫苗生产企业研制

的四价流感病毒裂解疫苗已获准上市,现对笔者所在公司研制的无硫柳汞四价流感病毒裂解疫苗^[2]进行稳定性评价,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 毒株 流感病毒毒株 A1 型(NYMC X-179A)、A3 型(NIB-88)、B1 型(B/Brisbane/60/2008, B/Victoria 系)和 B2 型(B/Phuket/3073/2013, B/Yamagata 系)均购自英国国家生物标准与检定所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)。

1.2 疫苗 按照流感病毒裂解疫苗制造及检定规程^[3],分别制备 A1、A3、B1、B2 型流感病毒单价原液。用 pH 7.2 的 PBS 溶液分别将 4 个型别的单价

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”课题(2014ZX09304315002)

作者简介: 蒋正东(1981-),男,医学生物学工程师,主要从事疫苗研究及生产管理工作。

通信作者: 蒋正东, E-mail: jiangzhengdong@gdkbio.com

原液稀释至血凝素(hemagglutinin , HA) 含量为每株 33 μg /mL ,经 0.22 μm 孔径滤膜过滤 ,即为四价流感病毒裂解疫苗半成品。共配制 3 批半成品 ,每批分装两个亚批 ,共计 6 批疫苗 ,批号分别为 S201510001-1、 S201510001-2、 S201510002-1、 S201510002-2、S201510003-1、S201510003-2 ,这 6 批疫苗均不含硫柳汞。

1.3 主要试剂及仪器 4 个型别的流感毒株抗体和抗原标准品均购自 NIBSC; 卵清蛋白检测试剂盒购自德国 Seramun Diagnostica GmbH 公司 ,采用酶联免疫法进行检测; 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠 ,均购自成都华邑药用辅料制造有限责任公司; 蔗糖、裂解剂 ,均购自德国 Merck 公司。全自动接种机、全自动收获机 ,均购自美国 RAME-HART 公司; 连续流超速区带离心机购自美国 ALFA WASSERMANN 公司; 层析柱购自 GE 公司; 超滤系统购自 Merck 公司; Model 680 酶标仪购自美国加州伯乐公司。

1.4 疫苗的检定 对 6 批疫苗进行全面检定 ,并将其中 1 批成品(批号: S201510001-1) 送中国食品药品检定研究院(National Institutes for Food and Drug Control , NIFDC) 全面检定。检定合格标准为: 外观、装量、无菌检查、异常毒性、鉴别试验、细菌内毒素含量、渗透压浓度均符合《中华人民共和国药典》2015 版(三部) 的要求^[3] ,其他检测指标按照企业注册标准(pH 6.8 ~ 8.0 ,游离甲醛质量浓度 ≤ 25 μg/mL ,血凝素(hemagglutinin , HA) 26.4 ~ 39.6 μg/mL ,总蛋白 ≤ 400 μg/mL ,卵清蛋白 ≤ 200 ng/mL) 进行判定。

1.5 疫苗的稳定性的研究 参照《中华人民共和国药

典》2015 版(四部 “原料药物与制剂稳定性试验指导原则”进行稳定性试验^[4]。HA 是流感病毒裂解疫苗的抗原有效成分 ,也是稳定性研究的关键指标。

1.5.1 热稳定性试验 将 6 批疫苗保存于(37±2) °C 条件下 ,于 5 d、10 d 分别取样进行外观、装量、鉴别试验、细菌内毒素含量、渗透压浓度、pH、游离甲醛含量、蛋白质含量、卵清蛋白含量、HA 含量检测 ,10 d 增加无菌检查和异常毒性试验。

1.5.2 加速稳定性试验 将 6 批疫苗保存于(25±2) °C 条件下 ,于 1 个月、2 个月、3 个月、6 个月分别取样进行外观、装量、鉴别试验、细菌内毒素含量、渗透压浓度、pH、游离甲醛含量、蛋白质含量、卵清蛋白含量、HA 含量检测 ,6 个月增加无菌检查和异常毒性试验。

1.5.3 长期稳定性试验 将 6 批疫苗保存于(6±2) °C 条件下 ,于 3 个月、6 个月、9 个月、12 个月、15 个月、18 个月分别取样进行外观、装量、鉴别试验、细菌内毒素含量、渗透压浓度、pH、游离甲醛含量、蛋白质含量、卵清蛋白含量、HA 含量检测 ,12 个月增加无菌检查和异常毒性试验。

1.6 统计学方法 用 EXCEL 2007 软件进行数据整理、分析及绘图。

2 结果

2.1 疫苗检定结果 6 批疫苗各项检测指标均合格 ,其中 ,卵清蛋白残留质量浓度平均为 5 ng/mL ,远低于企业注册标准(≤ 200 ng/mL) 。S201510001-1 批疫苗经 NIFDC 检定 ,各项检测指标均符合企业注册要求 ,见表 1。

表 1 四价流感病毒裂解疫苗检定结果

Tab.1 The tested results of QIV

| 疫苗批号 | pH | 游离甲醛 (μg/mL) | HA (μg/mL) | | | | 总蛋白 (μg/mL) | 卵清蛋白 (ng/mL) |
|---------------|---------|------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|------------------|
| | | | A1 | A3 | B1 | B2 | | |
| 企业注册标准 | 6.8~8.0 | ≤25 | 26.4~39.6 | 26.4~39.6 | 26.4~39.6 | 26.4~39.6 | ≤400 | ≤200 |
| S201510001-1 | 7.10 | 13 | 32.3 | 30.8 | 36.2 | 36.1 | 217 | 8 |
| S201510001-2 | 7.06 | 12 | 32.3 | 31.2 | 35.7 | 35.6 | 218 | 8 |
| S201510002-1 | 7.13 | 12 | 31.9 | 34.8 | 31.9 | 31.1 | 188 | 3 |
| S201510002-2 | 7.09 | 12 | 32.5 | 36.6 | 34.2 | 31.1 | 185 | 3 |
| S201510003-1 | 7.13 | 12 | 30.6 | 36.1 | 33.6 | 31.6 | 182 | 4 |
| S201510003-2 | 7.10 | 12 | 30.6 | 36.1 | 35.8 | 32.2 | 192 | 4 |
| S201510001-1* | 7.20 | 12 | 28.7 | 32.3 | 32.0 | 35.3 | 188 | 6 |

注: * 为 NIFDC 检定结果。

2.2 疫苗的稳定性研究

2.2.1 热稳定性试验 6批疫苗在(37±2)℃条件

下保存5 d、10 d,各项检测指标均符合要求。其中,各型别HA含量均有所下降,见图1。

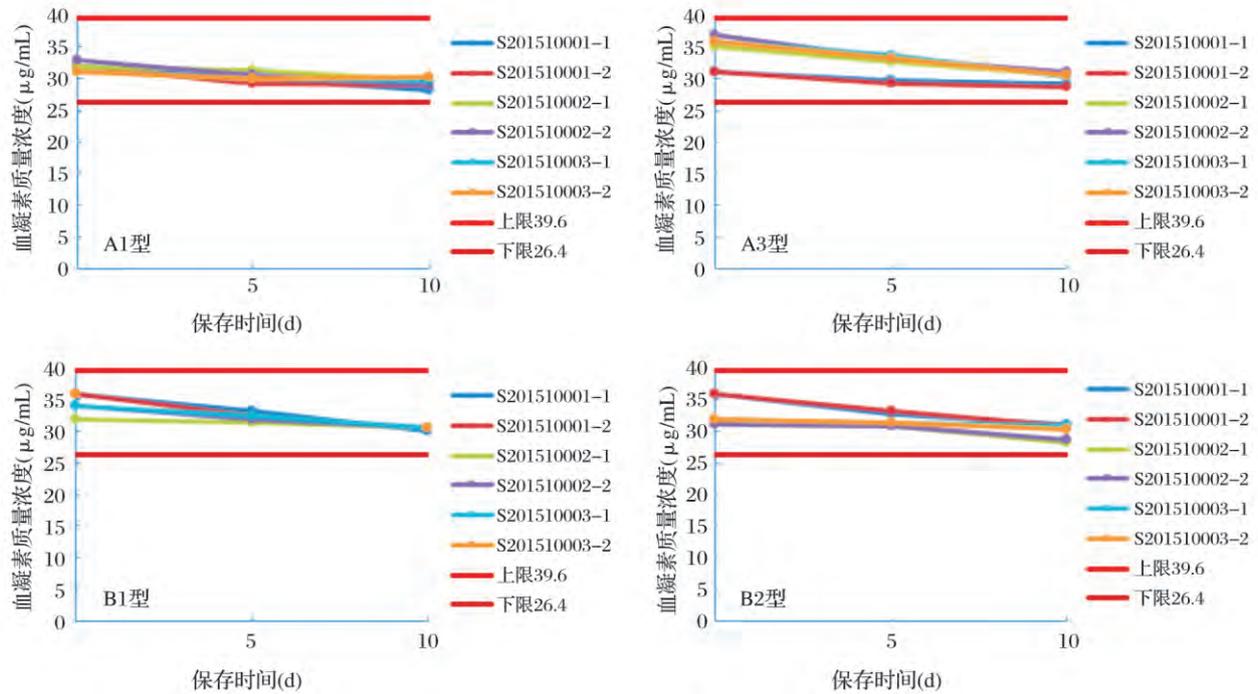


图1 稳定性试验 HA 趋势图 [(37±2)℃]

Fig.1 The trend chart of HA stability [(37±2)℃]

2.2.2 加速稳定性试验 6批疫苗在(25±2)℃条件下保存1个月、2个月、3个月时,各项检测指标均符合要求,各型别HA含量呈现逐步下降趋势,但仍

在企业注册标准范围内。当在(25±2)℃条件下保存6个月时,疫苗中各型别HA含量均超出企业注册标准下限,但各项检测指标均符合要求,见图2。

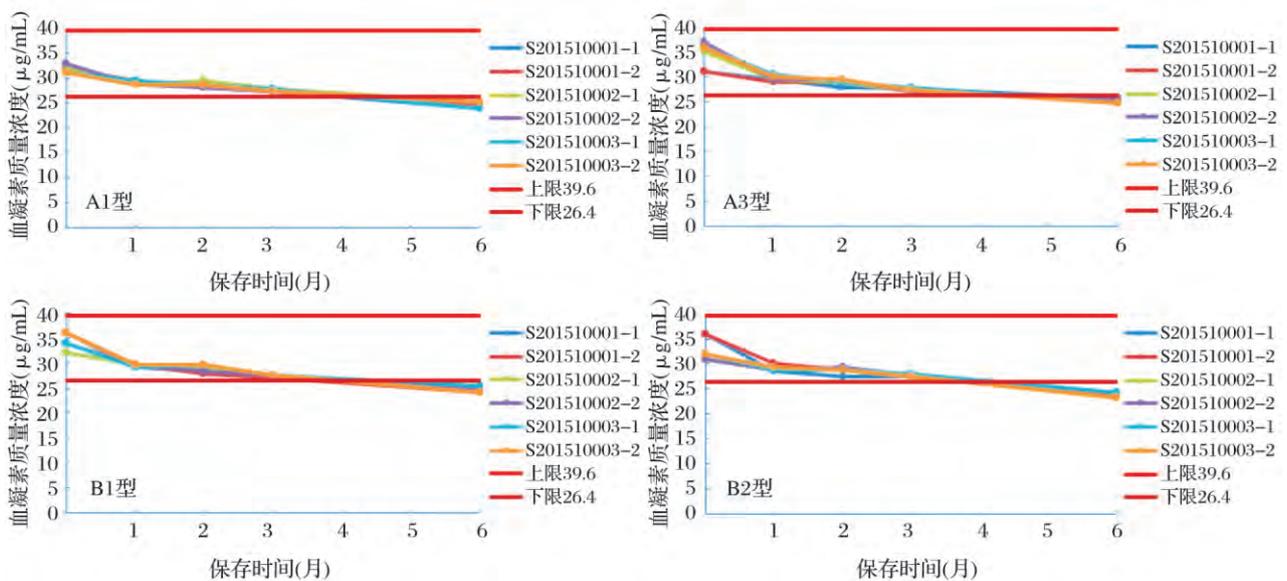


图2 稳定性试验 HA 趋势图 [(25±2)℃]

Fig.2 The trend chart of HA stability [(25±2)℃]

2.2.3 长期稳定性试验 6批疫苗在(6±2)℃条件下保存3个月、6个月、9个月、12个月、15个月时,检测指标均符合要求,各型别HA含量也呈现逐步下

降趋势,但仍在企业注册标准范围内。当疫苗在(6±2)℃条件下保存18个月时,HA含量超出企业注册标准下限,各项检测指标均符合要求,见图3。

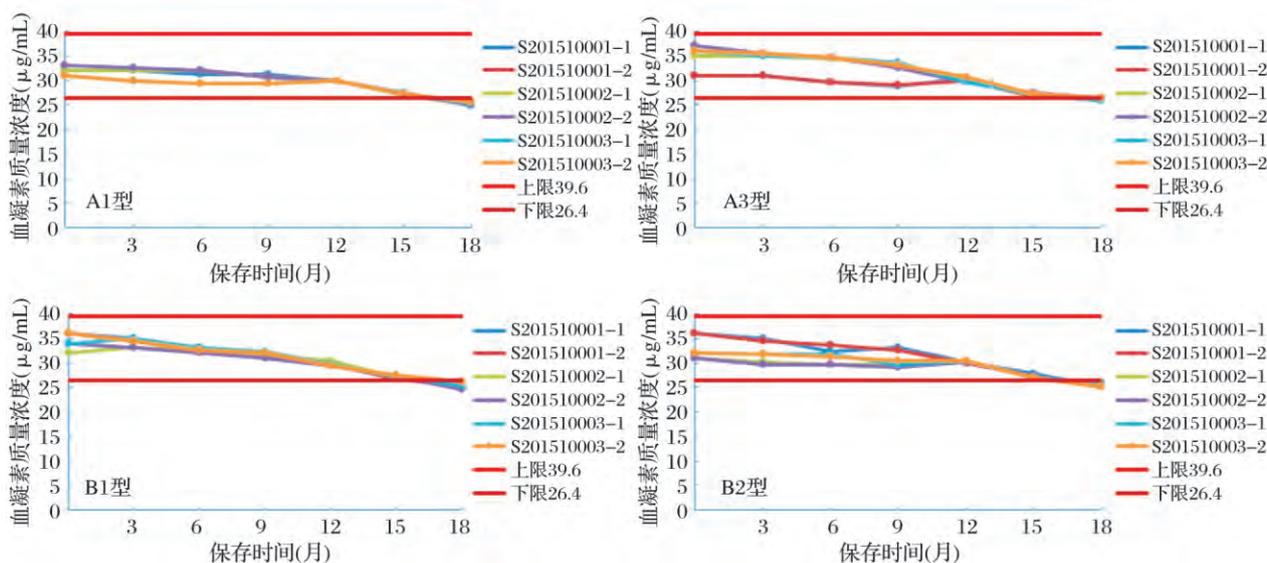


图3 稳定性试验 HA 趋势图(6±2)℃
Fig.3 The trend chart of HA stability(6±2)℃

3 讨论

按照《中华人民共和国药典》2015版(三部)的要求,流感病毒裂解疫苗均采用鸡胚工艺生产^[5],纯化工艺主要采用超速区带离心或凝胶(柱)层析法^[6]。为了提高疫苗的安全性,有的采用两步纯化(超速区带离心和凝胶(柱)层析法组合,或两次超速区带离心法组合)^[7],有的采用三步纯化(超速区带离心、凝胶(柱)层析法,再次超速区带离心法组合),三步纯化工艺可将疫苗主要过敏原卵清蛋白大幅降低,提高疫苗的安全性。本研究所用的疫苗均采用三步纯化工艺,成品检定结果显示,卵清蛋白残留量极低,远低于企业及国家标准,表明疫苗安全性更高。

硫柳汞是一种含有乙基汞的化合物,是疫苗中常用的防腐剂之一,但关于含硫柳汞疫苗的安全性问题一直存在争议^[8]。1999年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)为使疫苗更为安全,要求疫苗生产停止使用硫柳汞^[9]。赵大鹏等^[10]对相同生产工艺条件下制备的含硫柳汞和无硫柳汞三价流感病毒裂解疫苗的稳定性进行比较,结果表明,含硫柳汞与无硫柳汞流感病毒裂解疫苗HA稳定性数据无明显差异。本研究疫苗不含硫柳汞防腐剂,从而排除了防腐剂可能带来的不良反

应。

HA是流感病毒最主要的表面抗原,能诱导机体产生相应的中和抗体以中和病毒。HA含量是考核流感病毒裂解疫苗质量的关键指标,HA的稳定对疫苗的稳定性和有效性十分重要。吴金妍等^[7]研究表明,疫苗HA含量在效期内相对稳定,才能保证疫苗具有良好的免疫原性。结果显示,四价流感病毒裂解疫苗在(37±2)℃条件下保存10d,(25±2)℃条件下保存3个月,(6±2)℃条件下保存15个月,各项检测指标均符合企业注册标准和《中华人民共和国药典》2015版(三部)的要求。但在(25±2)℃条件下保存6个月,(6±2)℃条件下保存18个月,HA含量均超出企业注册标准下限,其他各项检测指标均符合要求。

综上所述,四价流感病毒裂解疫苗稳定性良好,依据疫苗有效期制定原则,四价流感病毒裂解疫苗在(6±2)℃的有效期初步确定为15个月。为该疫苗的上市应用提供了依据。

参考文献

[1] 吴建华,赵越. 四价流感疫苗预防季节性流感的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27(4): 319-321.
[2] 吴建华,路福平,赵越,等. 四价流感病毒裂解灭活疫苗的研制

[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2015, 29(5) : 391-395.

[3] 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, 2015: 193-195.

[4] 姚伟, 蒋正东, 李振辉, 等. 流感病毒裂解疫苗裂解剂去除工艺改进及稳定性研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, 41(6) : 12-16.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 354-356.

[6] 杨喆, 刘红岩, 马波, 等. 流感裂解疫苗纯化及裂解工艺的优化[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(1) : 36-39.

[7] 吴金妍, 郝佳俊, 程鹏飞, 等. 甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗的稳定性[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(9) : 1124-1126.

[8] 罗翀. 疫苗中硫柳汞的争议探讨[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(14) : 190-191.

[9] 戴宗祥, 高菁霞, 马磊, 等. 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[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(9) : 1100-1102.

[10] 赵大鹏, 姚为民, 谷丽娟, 等. 不含硫柳汞流感病毒裂解疫苗的稳定性[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(4) : 334-338.

收稿日期: 2017-07-21 修回日期: 2017-08-10

编辑: 陈凌云

致读者·作者

《微生物学免疫学进展》2018 年征订启事

《微生物学免疫学进展》1973 年创刊, 系中国生物技术股份有限公司主管、兰州生物制品研究所有限责任公司主办、中华预防医学会系列杂志之一。本刊宗旨为: 报道国内外微生物学、免疫学及相关领域的新理论、新进展、新方法、新技术、新成果等, 传播科技信息, 促进学术交流及应用, 为微生物学、免疫学及相关领域事业的发展与进步服务。

本刊系中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED) 统计源期刊、《中国学术期刊影响因子年报》统计源期刊、中国期刊全文数据库(CJFD) 收录期刊, 美国化学文摘(CA) 收录期刊, 中国知网、万方数据库、维普数据库全文收录期刊。《微生物学免疫学进展》曾于 2008 年荣获甘肃省优秀期刊奖、2009—2010 年度中华预防医学会系列杂志优秀期刊进步奖、2013—2014 年度中华预防医学会系列杂志编辑质量奖。

本刊为双月刊, 国内外公开发行。国际标准连续出版物号 ISSN 1005-5673, 国内统一连续出版物号 CN 62-1120/R, 国际标准开本(A4) 80 页, 全年 6 期, 定价 90 元(含邮资)。主要栏目有专家论坛、论著、综述、简报等, 欢迎科研院所、大专院校、医院、卫生防疫、生物制品公司、企业等单位的研发及生产部门读者订阅。

通信地址: 甘肃省兰州市盐场路 888 号《微生物学免疫学进展》编辑部
 邮政编码: 730046 电话: (0931) -8316208 传真: (0931) -8340711
 邮 箱: bjb5866@sina.com 在线投稿网址: <http://wsmy.cbpt.cnki.net>
 订阅方式: 本刊为自办发行, 请通过银行转帐, 不接受邮局订阅及汇款。
 开 户 行: 中国工商银行股份有限公司兰州桥北支行
 开户名称: 兰州生物制品研究所有限责任公司
 帐 号: 2703000309022104024

《微生物学免疫学进展》编辑部