

# 四价流感病毒亚单位疫苗的制备和检定

李雪峰 陈宁 徐朝静 姚蕊 阮承迈

**【摘要】目的** 建立四价流感病毒亚单位疫苗制备方法。**方法** 将4株毒种分别接种于9~11日龄的健康鸡胚尿囊腔中,在33~35 °C培养箱培养48~72 h后,冷胚处理,收获尿囊液,经澄清、病毒灭活、裂解和纯化,除菌过滤制成单价疫苗原液;利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法,分析有效成分及纯度。将收获的4种单价疫苗原液进行混配,制成四价流感病毒亚单位疫苗。最终按《中华人民共和国药典》2015年版对成品疫苗进行全面检定。**结果** 成功制备出四价流感病毒亚单位疫苗,其有效成分血凝素含量占总蛋白比例为91.4%。4种疫苗株血凝素含量分别为H1N1: 30 µg/ml、H3N2: 34 µg/ml、B1: 36 µg/ml、B2: 30 µg/ml,对成品的检定完全合格。**结论** 本研究所制备的四价流感亚单位疫苗符合生产和检定规程要求。

**【关键词】** 四价流感病毒亚单位疫苗; 四价, 流感, 疫苗, 乙型

**Preparation and verification of tetravalent influenza virus subunit vaccine** Chen Ning, Li Xuefeng, Xu Zhaojing, Yao Rui, Ruan Chengmai. Department Research and Development, Zhongyianke Biotechnology Co., Ltd. Tianjin 300300, China

Corresponding author: Ruan Chengmai, Email: ruanc@foxmail.com

**【Abstract】Objective** To prepare the 4-valent influenza virus subunit vaccine. **Methods** Four strains of virus were inoculated into the allantoic cavity of healthy chicken embryo which were 9 to 11 days old. After incubated at 33-35 °C for 48-72 h, the embryos were cooled and the allantoic fluid was harvested. Following virus inactivation, lysis and purification, sterilization and filtration were applied to prepare a monovalent vaccine stock solution; polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to analyze the purity. The harvested four monovalent stocks are mixed to prepare a tetravalent influenza virus subunit vaccine. Finally, the finished product vaccine was fully verified according to the Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2015 edition).

**Results** The tetravalent influenza virus subunit vaccine was successfully prepared, among which hemagglutinin accounted for 91.4% of the total protein. The hemagglutinin of the four vaccine strains were H1N1 for 30 µg/ml, H3N2 for 34 µg/ml, B1 for 36 µg/ml, and B2 for 30 µg/ml, respectively. **Conclusion** The four-valent influenza subunit vaccine produced meets the requirements of production and verification.

**【Key words】** Tetravalent influenza virus subunit vaccine; Influenza; Vaccine; Type B influenza virus

流行性感冒(influenza)是由流行性感冒病毒(简称流感病毒)引起的急性呼吸道传染病,是全世界范围内流行最为广泛的上呼吸道疾病之一,已成为全球患病人数最多的疾病,目前尚无特别有效的治疗方法。接种流感疫苗是预防和控制流感最经济、最有效的手段<sup>[1-2]</sup>。但截止目前,已上市的季节性流感疫苗均为三价流感疫苗,其包括甲1型(H1N1)、甲3型(H3N2)两种甲型毒株和一种乙型毒株。流感病毒分为甲(A)、乙(B)、丙(C)三型,乙型流感病毒株又分为基因和抗原独特的B/Victoria、B/Yamagata两个系<sup>[3]</sup>,这两个系乙型流感病毒株在流感传播

中一直占主导地位<sup>[4]</sup>。我国国家流感中心报道,自2017年4月以来,检测到的流感病毒以B/Yamagata系为主,其中B(Yamagata)系508株(96.9%)为B/Phuket/3073/2013类似株<sup>[5]</sup>。因此,世界卫生组织建议四价流感疫苗包应含2种乙型流感病毒<sup>[6]</sup>,从而更有效地预防流感的发生和传播。因此,国内外许多生物制药企业开始四价流感疫苗的研制。本文对四价流感亚单位疫苗制备和检定过程进行了概述,报道如下。

## 材料与amp;方法

### 一、研究材料

所采用毒株为流感病毒甲型H1N1毒株(A/California/7/2009)、甲型H3N2毒株(A/

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2019.06.013

基金项目:天津市科技计划项目(No.17ZXSCSY00010)

作者单位:300410天津,中逸安科生物技术股份有限公司

通信作者:阮承迈,Email: ruanc@foxmail.com

Switzerland/9715293/2013)、乙型(B1)毒株(B/Phuket/3073/2013)和乙型(B2)B/NYMC BX-35株均来源于英国国家生物标准和检定所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC),购自北京中原公司。

鸡胚为海兰白鸡所产种蛋,购自天津龙威禽业有限公司。于37.8℃、相对湿度50%的条件下培育9~11 d。

主要试剂蛋白Marker(14000-97400 Da),购自BIO-RAD; SDS-PAGE所用试剂和二巯基丙醇均购自Sigma公司。

## 二、研究方法

四价流感病毒亚单位疫苗的制备以甲型H1N1病毒原液的制备方法为例,其余原液制备参数均相同。

1. 病毒接种及培养:将已清洁完毕的受精卵装盘,气室端向上,置孵化机中孵化9~11 d(温度35~37℃,相对湿度50%~70%,每2 h自动翻蛋1次)。孵化结束后,取出进行灯检。将灯检合格的鸡胚,在规定位置做出打孔标记,并以75%酒精喷淋消毒。在鸡胚标记处上方打孔,用无菌注射器将已稀释好的病毒液0.2 ml接种到每只鸡胚的尿囊腔中。随后将其移入孵化机内进行病毒培养48~72 h(温度33℃~35℃,相对湿度50%~70%,每2 h自动翻蛋1次)。将鸡胚置于2℃~8℃冷藏。

病毒收获冷藏后,以75%酒精喷淋消毒。将鸡胚气室部位的蛋壳去掉,剥离壳膜,暴露出鸡胚尿囊腔,吸取尿囊液并收集为单次收获液。

2. 病毒灭活和浓缩:向所收集的单次收获液内加入甲醛溶液,使甲醛最终浓度为200 μg/ml,在2~8℃下搅拌灭活5 d。将灭活后的单次收获液通过超滤系统浓缩。

3. 病毒裂解及纯化:在浓缩液中加入适当浓度裂解剂(壬苯醇醚-9),作用3 h后通过蔗糖密度区带离心法进行纯化,通过电镜观察裂解前后病毒形态。

4. 原液制备:经裂解及纯化得到纯化病毒原液,经过分子筛层析进一步纯化,得到纯化裂解病毒原液,经除

菌过滤为单价原液,装瓶,置于2℃~8℃保存。H3N2、B1、B2纯化裂解病毒原液的制备同以上方法制备。

5. 半成品配制:将以上各病毒原液经过单向免疫扩散方法检测后,用无菌磷酸盐缓冲液稀释至含有血凝素不低于120 μg/ml后,等体积混合,得到半成品,而后除菌过滤、分装,置于2℃~8℃保存。

6. 四价流感病毒亚单位疫苗抗原纯度分析:流感病毒经一系列分离纯化过程后得到疫苗组分和非疫苗组分,将两种蛋白组分在还原(上样缓冲液中含β-巯基乙醇)和非还原条件下,分别取10 μg/孔经SDS-PAGE(12%分离胶)分离,得到其有效蛋白成分。

7. 四价流感病毒亚疫苗的检定:按照《中华人民共和国药典》2015版三部中“流感病毒裂解疫苗”相关规程,对本研究生产的四价流感病毒亚单位疫苗进行鉴别试验、外观、装量、pH值、蛋白质含量、血凝素含量、卵清蛋白含量、无菌、异常毒性、渗透压等检定。

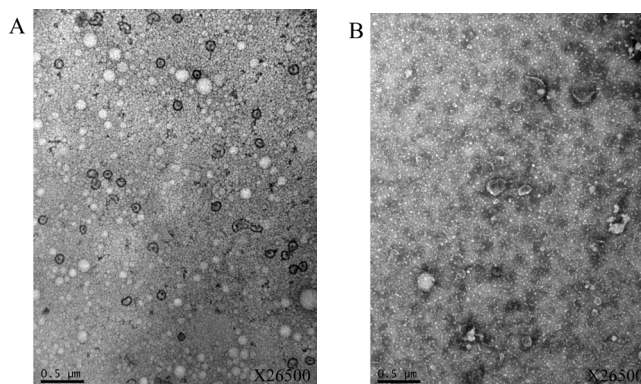
## 结 果

### 一、病毒裂解前后电镜观察

病毒收获液经裂解反应后,电镜观察其病毒颗粒有显著变化(病毒表面清晰的边界消失,表明病毒表面脂质膜溶解),见图1。

### 二、四价流感病毒亚单位疫苗抗原纯度分析

将NYMC BX-35(B2)毒种接种于9~11日龄的健康鸡胚,培养48~72 h后,收获尿囊液,经甲醇灭活、超滤浓缩、壬苯醇醚-9裂解、梯度密度离心等步骤得到单价原液,其中的疫苗组分与非疫苗组分,将两种组分分别经SDS-PAGE电泳分离其有效成分。结果表明,疫苗组分的有效成分在还原条件下(即样本经二巯基丙醇处理,标记为R)分离出两种主要成分,即在约40 kDa条带为HA1蛋白,约30 kDa条带为HA2蛋白。经AlphaImager软件分析,



注: A: 病毒颗粒裂解前(×265 000); B: 病毒颗粒裂解后(×265 000)

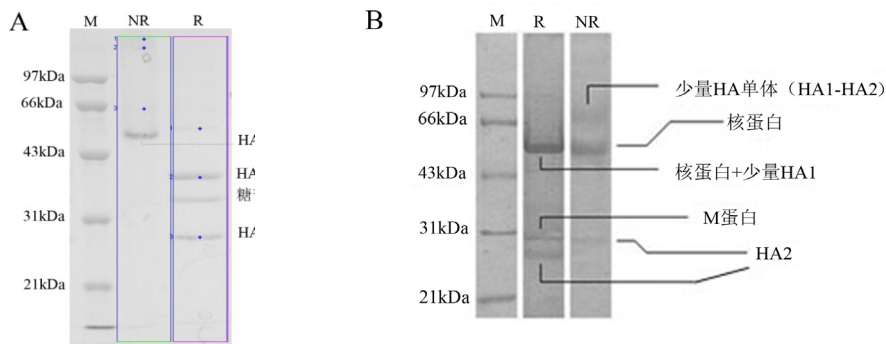
图1 B型流感病毒裂解电镜图

其纯度为91.4%；在非还原条件下（即样本未经二巯基丙醇处理，标记为NR。）疫苗组分经分离，在约90 kDa出现明显条带，为HA单体（HA1-HA2二聚物），并伴随少量核蛋白（图2A）。非疫苗组分在还原条件下经SDS-PAGE电泳分离得带到核蛋白与少量HA1（约50 kDa），M蛋白（约31 kDa）及少量HA2（约30 kDa）。在非还原条件下经分

离得到少量HA单体（HA1-HA2二聚物），核蛋白以及M蛋白（图2B）。

### 三、四价流感病毒亚疫苗的检定

本研究所制备的四价流感病毒亚单位疫苗（批号：20170201），按照《中华人民共和国药典》2015版“流感病毒裂解疫苗”的检定要求进行全面检定，结果见表1。



注：A：疫苗组分SDS-PAGE电泳结果图；B：非疫苗组分电泳结果图。M：蛋白质分子量标准，NR：非还原处理样品，R：还原处理样品

图2 B型流感病毒亚单位组分SDS-PAGE电泳图谱

表 1 四价流感病毒亚单位疫苗检定

项目	《中华人民共和国药典》标准	检定结果
鉴别试验	抗原性与推荐毒株相一致	一致
外观	为微乳白色液体且无异物	微乳白色液体且无异物
装量	不低于标示量	0.56~0.59 ml
pH值	6.80~8.00	7.20
蛋白质含量	≥ 400 μg/ml且不超过疫苗中血凝素含量的4.50倍	272 μg/ml
血凝素含量	每毫升中各型流感病毒毒株血凝素含量应为配置量的80%~120%	H1N1: 30 μg/ml; H3N2: 34 μg/ml; B1: 36 μg/ml; B2: 30 μg/ml
卵清蛋白含量	不高于300 ng/ml	196 ng/ml
无菌检查	无菌	无菌生长
异常毒性检查	健存，体重增加	符合规定
细菌内毒素检查	不高于20 EU/ml	符合规定
游离甲醛含量	不超过40 μg/ml	21 μg/ml
渗透压摩尔浓度	符合通则0632要求	261 mOsmol/kg

## 讨 论

流感病毒流行至今，有四次大规模的流行，其中最严重的一次为西班牙1918至1920年所暴发的流行性感冒，造成5亿~10亿人死亡<sup>[7]</sup>。1968年的甲3型流感病毒（H3N2）的暴发起源于我国香港，疫情迅速蔓延到全世界，死亡人数过百万<sup>[8]</sup>。据估计，流行性感冒每年均有暴发和流行，5%~10%成人和20%~30%儿童会被感染<sup>[9-10]</sup>。为降低流行性感冒所带来的严重经济损失及人口的高患病率，研制四价流感疫苗已经成为新型流感疫苗产品的发

展方向<sup>[11-17]</sup>。因此，本研究在已有三价流感病毒亚单位疫苗（B/Phuket/3073/2013 Yamagata系）基础上，增加Victoria系的B2型（B/Brisbane/60/2008）流感病毒毒株，扩大疫苗的免疫范围，提高了免疫效率。截止目前，国内有3家生产四价流感病毒感疫苗的公司，但工艺方法为裂解技术，裂解疫苗因在纯化方法上不同，在产品中仍存在病毒核蛋白（M蛋白），可能导致较多的不良反应<sup>[18-22]</sup>。本研究制备的四价流感病毒亚单位疫苗很大程度上解决了这一问题。

本研究结果显示，在原有三价亚单位疫苗基础上，利用B2型流感病毒株接种所生产出的单价原液蛋白纯度高，

特异性强。在研制混配过程中, B1与B2株所生产出的单价原液具有明显的交叉抗原抗体反应(数据未列出)。同时, 检定结果表明, 四价流感病毒亚单位疫苗符合《中华人民共和国药典》2015年版流感产品质量标准, 并已于2017年11月申请新药临床研究。

### 参 考 文 献

- [1] Stohr K. Influenza--WHO cares[J]. *Lancet Infect Dis*,2002,2(9):517.
- [2] Lin J, Kang M, Zhong H, et al. Influenza seasonality and predominant subtypes of influenza virus in Guangdong, China, 2004-2012[J]. *J Thorac Dis*,2013,5(2):109-117.
- [3] Peng Z, Feng L, Carolyn GM, et al. Characterizing the epidemiology, virology, and clinical features of influenza in China's first severe acute respiratory infection sentinel surveillance system, February 2011-October 2013[J]. *BMC Infect Dis*,2015,15(1):143.
- [4] Cheng X, Tan Y, He M, et al. Epidemiological dynamics and phylogeography of influenza virus in southern China[J]. *J Infect Dis*,2013, 207(1):106-114.
- [5] 中国国家流感中心. 2018第02周流感周报[EB/OL]. <http://www.chinaivdc.cn/cnic/zyzx/lgzg/201801/t20180121158316.htm>.
- [6] 宋伟凡. 世界卫生组织关于2015-2016年北半球流行性感冒流行季节流行性感冒疫苗组成成分的推荐意见[J]. *中国疫苗和免疫*,2015,21(3):277.
- [7] Morens DM, Taubenberger JK. Influenza Cataclysm, 1918[J]. *N Engl J Med*,2018,379(24):2285-2287.
- [8] Oxford JS. Influenza A pandemics of the 20th century with special reference to 1918: virology, pathology and epidemiology[J]. *Rev Med Virol*,2000,10(2):119-133.
- [9] Christensen D, Christensen JP, Korsholm KS, et al. Seasonal influenza split vaccines confer partial cross-protection against heterologous influenza virus in ferrets when combined with the CAF01 adjuvant[J]. *Front Immunol*,2018,8:1928.
- [10] Ambrose CS, Levin MJ. The rationale for quadrivalent influenza vaccines[J]. *Hum Vaccin Immunother*,2012,8(1):81-88.
- [11] Ampofo WK, Azziz-Baumgartner E, Bashir U, et al. Strengthening the influenza vaccine virus selection and development process: report of the 3rd WHO Informal Consultation for Improving Influenza Vaccine Virus Selection held at WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 1-3 April 2014[J]. *Vaccine*,2015,33(36):4368-4382.
- [12] Barberis I, Myles P, Ault SK, et al. History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines[J]. *J Prev Med Hyg*,2016,57(3):E115-E120.
- [13] Bart S, Cannon K, Herrington D, et al. Immunogenicity and safety of a cell culture-based quadrivalent influenza vaccine in adults: a Phase III, doubleblind, multicenter, randomized, non-inferiority study[J]. *Hum Vaccin Immunother*,2016,12(9):2278-2288.
- [14] Black S, Nicolay U, Vesikari T, et al. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children[J]. *Pediatr Infect Dis J*,2011,30(12):1081-1085.
- [15] de Jong JC, Palache AM, Beyer WE, et al. Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus[J]. *Dev Biol (Basel)*,2003,115:63-73.
- [16] Domachowski JB, Pankow-Culot H, Bautista M, et al. A randomized trial of candidate inactivated quadrivalent influenza vaccine versus trivalent influenza vaccines in children aged 3-17 years[J]. *J Infect Dis*,2013,207(12):1878-1887.
- [17] Englund JA, Walter EB, Gbadebo A, et al. Immunization with trivalent inactivated influenza vaccine in partially immunized toddlers[J]. *Pediatrics*,2006,118(3):e579-e585.
- [18] Glezen WP, Couch RB, Taber LH, et al. Epidemiologic observations of influenza B virus infections in Houston, Texas, 1976-1977[J]. *Am J Epidemiol*,1980,111(1):13-22.
- [19] Glezen WP, Schmier JK, Kuehn CM, et al. The burden of influenza B: a structured literature review[J]. *Am J Public Health*,2013,103(3):e43-e51.
- [20] Greenberg DP, Robertson CA, Landolfi VA, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated quadrivalent influenza vaccine in children 6 months through 8 years of age[J]. *Pediatr Infect Dis J*,2014,33(6):630-636.
- [21] Hartvickson R, Cruz M, Ervin J, et al. Non-inferiority of mammalian cell-derived quadrivalent subunit influenza virus vaccines compared to Journal Pre-proof trivalent subunit influenza virus vaccines in healthy children: a phase III randomized, multicenter, double-blind clinical trial[J]. *Int J Infect Dis*,2015,41:65-72.
- [22] You JH, Ming WK, Chan PK. Cost-effectiveness of quadrivalent influenza vaccine in Hong Kong--a decision analysis[J]. *Hum Vaccin Immunother*,2015,11(3):564-571.

(收稿日期: 2019-02-28)

(本文编辑: 孙荣华)

李雪峰, 陈宁, 徐朝静, 等. 四价流感病毒亚单位疫苗的制备和检定[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2019,13(6):524-527.