

# 甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗的稳定性

吴金妍, 郁佳俊, 程鹏飞, 周峰

上海生物制品研究所有限责任公司, 上海 200052

**摘要:** 目的 考察甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗的稳定性, 以保证临床用药质量。方法 将 3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗分别于 37 ℃ 和 2 ~ 8 ℃ 放置不同时间, 进行鉴别试验、外观、装量、pH、血凝素含量、硫柳汞含量、无菌检查、异常毒性检查、细菌内毒素含量、卵清蛋白含量等全项目检测, 观察疫苗的热稳定性和长期稳定性。结果 3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗于 37 ℃ 放置 7 d, 各项指标均符合甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗制造和检定规程要求, 且与 0 d 结果比较无明显差异; 3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗于 2 ~ 8 ℃ 放置 18 个月, 各项指标均达到合格要求。结论 甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗的热稳定性及长期稳定性均良好, 表明甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗质量稳定。

**关键词:** 甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗 稳定性

中图分类号: R373.1+3 R392-33 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2014)09-1124-03

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.000519

## Stability of Influenza A H1N1 vaccine (split virion), inactivated

WU Jin-yan, YU Jia-jun, CHENG Peng-fei, ZHOU Feng

Shanghai Institute of Biological Products Co., Ltd., Shanghai 200052, China

Corresponding author: WU Jin-yan, E-mail: wujinyan1@sinopharm.com

**Abstract:** **Objective** To evaluate the stability of influenza A H1N1 vaccine (split virion), inactivated. **Methods** Three batches of vaccine were stored at 37 and 2 ~ 8 ℃ for various time periods, then subjected to inspection on final containers and tested for identity, filling volume, pH value, hemagglutinin (HA) content, thimerosal content, sterility, abnormal toxicity, bacterial endotoxin content and egg albumin content, based on which the thermo-stability and long-term stability were evaluated. **Results** All the quality indexes of three batches of vaccine after storage at 37 ℃ for 7 d met the requirements for influenza A H1N1 vaccine (split virion), inactivated, which showed no significant difference with those before storage. All the indexes of the three batches were qualified after storage at 2 ~ 8 ℃ for 18 months. **Conclusion** Inactivated influenza A H1N1 vaccine (split virion) showed high thermo-stability and long-term stability, indicating stable quality of the vaccine.

**Key words:** Influenza A H1N1 vaccine (split virion), inactivated; Stability

世界卫生组织(WHO)发布的流行病学数据显示,甲型 H1N1 流感的易感人群、并发症和重症风险人群以年轻人及具有基础性疾病的人群为主,尤以年轻人的发病率较高<sup>[1]</sup>,而接种疫苗是预防甲型 H1N1 流感流行的主要措施。

甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗系用 WHO 推荐, WHO 合作中心分发,并经国家药品管理部门批准的甲型 H1N1 流感病毒株接种鸡胚,经培养、收获病毒液,浓缩、裂解和纯化后制成,用于预防甲型 H1N1 流感。作为裂解疫苗,其中血凝素含量对疫苗的免疫效果具有重要影响,而制品的保存条件和时间会影响血凝素含量的稳定。虽然甲流疫苗与普通流感疫苗的生产工艺流程相似<sup>[2-3]</sup>,但作为新毒株及新制

品,其免疫原性及质量仍需进一步观察。为了考察制品的稳定性,保证疫苗的安全有效,本实验进行了甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗的稳定性观察,现将结果报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 疫苗** 3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗[规格为 15 μg/(0.5 ml·瓶),批号分别为 20090701、20090704 和 20090707]和普通流感病毒裂解疫苗(作为对照疫苗,批号为 200907018,0.5 ml/瓶)均为本公司制备,含各型流感病毒株血凝素 15 μg。

**1.2 标准抗原** TGA(therapeutic goods administration)标准抗原购自澳大利亚治疗用品管理局, NIBSC 标

通讯作者: 吴金妍, E-mail: wujinyan1@sinopharm.com

准抗原购自英国国家生物制品检定所(National Institute for Biological Standards and Control)。

1. 3 主要试剂 相应(亚)型流感病毒特异性免疫血清和抗体参考品均购自 NIBSC。

1. 4 热稳定性试验 根据课题组设计的甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗 37 ℃热稳定性试验方案进行试验 :将 3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗和对照疫苗于 37 ℃分别放置 0、3、7 d ,对成品项目部分检定或全部检定。

1. 5 长期稳定性试验 参照《中国药典》二部(2005 版)附录 C《原料药与药物制剂稳定性试验指导原则》,设计甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗长期稳定性试验方案 :将 3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗于 2 ~ 8 ℃分别放置 0、3、6、12、18 个月 ,对成品项目进行全部检定 ;分别于放置 1、2、4、5、7、8、9、10、11、15 个月 ,进行部分项目检定。检测方法和质量标准参照《甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗注册标准》。

1. 6 各项指标的检测

1. 6. 1 鉴别试验 用相应(亚)型流感病毒特异性免疫血清进行单向免疫扩散试验 ,结果应证明抗原性与推荐病毒株相一致。

1. 6. 2 外观检测 应为轻微乳白色液体 ,无异物。

1. 6. 3 装量检测 按《中国药典》三部(2010 版)附录 A 中装量项进行 ,应不低于标示量。

1. 6. 4 pH 值检测 按《中国药典》三部(2010 版)附录 A 进行 ,应为 6. 8 ~ 7. 5。

1. 6. 5 游离甲醛含量检测 按《中国药典》三部(2010 版)附录 L 进行 ,应不高于 25 μg/ml。

1. 6. 6 血凝素含量检测 将抗原参考品和成品分别加入含有抗体参考品的琼脂糖凝胶板上 ,孔径为 2 ~ 4 mm ,于 20 ~ 25 ℃扩散至少 18 h ,PBS 浸泡 1 h 后 ,干燥、染色、脱色。测量抗原参考品和成品形成的沉淀环直径 ,以抗原参考品形成的沉淀环直径对

其相应抗原浓度进行直线回归 ,得到直线回归方程 ,代入成品的沉淀环直径 ,即可得到血凝素含量。血凝素含量应为 24 ~ 36 μg/ml。

1. 6. 7 总蛋白质含量检测 按《中国药典》三部(2010 版)附录 B 第二法进行 ,应不高于 200 μg/ml ,并不得超过疫苗中血凝素总含量的 5 倍。

1. 6. 8 卵清蛋白含量检测 采用酶联免疫法(仲裁方法)或对流免疫电泳法 ,应不高于 100 ng/ml。

1. 6. 9 无菌检查 按《中国药典》三部(2010 版)附录 A 进行 ,应符合规定。

1. 6. 10 异常毒性检查 按《中国药典》三部(2010 版)附录 F 进行 ,应符合规定。

1. 6. 11 细菌内毒素检查 按《中国药典》三部(2010 版)附录 E 凝胶限量试验 ,应小于 40 EU/ml。

1. 6. 12 硫柳汞含量检测 应为 85 μg/ml ± 15%。

2 结 果

2. 1 热稳定性 检测结果显示 ,3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗于 37 ℃放置 7 d ,鉴别试验、外观、装量、无菌检查和异常毒性检查结果均合格 ,其他各项指标均符合甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗制造和检定规程要求 ,且与 0 d 结果比较无明显差异 ,见表 1。对照疫苗于 37 ℃放置 7 d ,各项指标检查结果均合格 ,均符合流感病毒裂解疫苗制造和检定规程要求 ,且与 0 d 结果比较无明显差异 ,见表 2。

2. 2 长期稳定性 检测结果显示 ,3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗于 2 ~ 8 ℃放置 18 个月 ,鉴别试验、外观、装量、pH、硫柳汞含量、无菌检查、异常毒性检查、细菌内毒素含量、卵清蛋白含量均合格 ,均符合甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗制造和检定规程要求 ,且与 0 月结果比较无明显差异 ,血凝素含量也较稳定 ,与 0 月相比 ,无明显差异 ,均在正常范围(12 ~ 18 μg/0. 5 ml)内。见图 1。

表 1 3 批甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗 37 ℃热稳定性试验结果

Tab 1. Thermo-stability of three batches of influenza A H1N1 vaccine at 37 ℃

检定项目	检测标准	20090701 批			20090704 批			20090707 批		
		0 d	3 d	7 d	0 d	3 d	7 d	0 d	3 d	7 d
pH	6. 8 ~ 7. 5	7. 2	-	7. 2	7. 2	-	7. 2	7. 2	-	7. 2
游离甲醛含量(μg/ml)	≤ 25	8	-	8	11	-	11	8	-	8
硫柳汞含量(μg/ml)	70 ~ 100	86	-	86	77	-	77	89	-	89
血凝素含量(μg/0. 5 ml)	12 ~ 18	13	14	13	13	14	13	13	14	14
细菌内毒素含量(EU/ml)	≤ 40	< 16	-	< 8	< 4	-	< 4	< 8	-	< 4
总蛋白含量(μg/ml)	≤ 200 μg/ml ,并不得超过疫苗中血凝素含量的 5 倍	110	-	101	125	-	114	120	-	96
卵清蛋白含量(ng/ml)	≤ 100	1	-	1	3	-	3	1	-	1

表 2 对照疫苗 37 ℃热稳定性试验结果

Tab 2. Thermo-stability of control vaccine at 37 ℃

检定项目	检测标准	检测结果		
		0 d	3 d	7 d
pH	6.8 ~ 7.5	7.2	-	7.2
游离甲醛含量(μg/ml)	≤ 25	15	-	15
硫柳汞含量(μg/ml)	70 ~ 100	74	-	74
血凝素含量(μg/ml)	各(亚)型血凝素应 24 ~ 36	A1 : 35	A1 : 33	A1 : 33
		A3 : 33	A3 : 32	A3 : 31
		B : 33	B : 33	B : 32
细菌内毒素含量(EU/ml)	≤ 40	< 2	-	< 4
总蛋白含量(μg/ml)	≤ 400 并不得超过疫苗中血凝素含量的 5 倍	263	-	261
卵清蛋白含量(ng/ml)	≤ 100	2	-	2

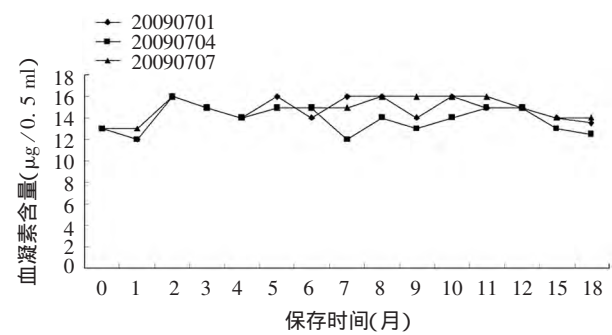


图 1 甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗 2 ~ 8 ℃长期稳定性试验结果

Fig 1. Long-term stability of influenza A H1N1 vaccine at 2 ~ 8 ℃

3 讨论

流感病毒属于正黏病毒科<sup>[4]</sup>,病毒体为多形性结构,核衣壳为螺旋对称,病毒表面的包膜上含有血凝素和神经氨酸酶。血凝素是一类蛋白质,病毒依靠血凝素与宿主细胞结合,因此其为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,具有保护作用。血凝素抗体为中和抗体,因此,抵抗感染的发生与血凝素抗体有关,且疫苗血凝素的含量是影响免疫接种效果的重要因素。血凝素含量是考核疫苗质量的关键指标,血凝素的稳定对疫苗的稳定性十分重要。疫苗血凝素含量较高,并在效期内相对稳定,才能保证疫苗具有良好的免疫原性。由于流感疫苗主要以血凝素含量作为效力指标,因此,血凝效价的测定是评估疫苗质量最客观、可和和重要的指标。

本实验观察的疫苗系经病毒培养、浓缩、第 1 次

纯化、病毒裂解、第 2 次纯化等工艺制成。纯化保留了病毒中核蛋白和膜蛋白等内部抗原、血凝素和神经氨酸酶表面抗原等有效成分,去除了具有反应原性的病毒类脂质部分,降低了疫苗的接种副反应,并保持相对较高的免疫原性,为一种理想的流感疫苗。经临床试验证实,具有良好的安全性和有效性(尚未发表)。本实验观察了该疫苗的稳定性,结果表明,甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗热稳定性和长期稳定性均良好,在 2 ~ 8 ℃储存条件下,疫苗的效期可定为 12 个月。2010 年版《美国药典》(32 版)收载了流感疫苗,并将有效期定为 1 年<sup>[5]</sup>。本公司研制的甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗质量稳定,达到了发达国家药典的要求。

参考文献

[1] 尉岚,高虹. 甲型 H1N1 流感危害与疫苗政策简介 [J]. 中国预防医学杂志, 2010(6) : 648-649.

[2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China(Vol ) [S]. Beijing : China Med Sci Press , 2010 : 162-164. (in Chinese)

国家药典委员会. 中国药典(三部) [S]. 北京 : 中国医药科技出版社, 2010 : 162-164.

[3] 国家食品药品监督管理局. 流感病毒裂解疫苗药品注册标准 [S]. WS4-(ZB-002)2011. 2011-06-01.

[4] Zhao K , Zhang YH , Li HM. Medical Biology [M]. Zn ed. Bei-jing : People's Medical Publishing House , 2007 : 805-816.(in Chinese)

赵铠,章以浩,李河民. 医学生物制品学 [M]. 2 版. 北京 : 人民卫生出版社, 2007 : 805-816.

[5] The United States Pharmacopeial Convention. U. S. Pharmar-copoeia 33 [S]. Rockville , MD : Board of Trustees , 2010 : 1132.

收稿日期 2014-01-02 编辑 :何巍