

## - 丙内酯在 Vero 细胞 HFRS 疫苗中的应用

陈伟<sup>1</sup>, 李忠义<sup>2</sup>, 刘江秋<sup>2</sup>, 于笑难<sup>3</sup>, 薛采芳<sup>1</sup>, 蔡群<sup>4</sup>, 徐璐<sup>5</sup>, 廖辉<sup>5</sup>

**摘要:**目的 探讨 - 丙内酯灭活双价 Vero 细胞肾综合征出血热纯化疫苗的最佳条件。方法 采用不同终浓度的 - 丙内酯和不同的灭活时间对疫苗进行灭活,用细胞培养法进行病毒增殖试验,以确定灭活效果。应用高效液相色谱法分析 - 丙内酯的最佳水解条件和 3 批双价 vero 细胞出血热纯化灭活疫苗 - 丙内酯残留量。检测 3 批双价纯化灭活疫苗的免疫效果。结果 疫苗经终浓度为 1 2 000 和 1 4 000 的 - 丙内酯作用 24 h,均可完全灭活病毒;疫苗中的 - 丙内酯在 37 ℃ 水浴下,随着水解时间的延长,其含量逐渐下降,水解 2 h 后已无 - 丙内酯检出;3 批经 - 丙内酯灭活的双价 Vero 细胞出血热纯化疫苗均未检出 - 丙内酯残留,在家兔体内诱导产生针对汉滩型和汉城型病毒的中和抗体效价均达到 1 20。结论 肾综合征出血热纯化疫苗经终浓度为 1 4 000 - 丙内酯 4 ℃ 灭活 24 h,然后再于 37 ℃ 水浴中水解 2 h,既可达到完全灭活病毒且无 - 丙内酯残留的目的;采用此方法灭活的双价 Vero 细胞肾综合征出血热纯化疫苗保持良好的免疫原性。

**关键词:** 肾综合征出血热;疫苗;Vero 细胞;- 丙内酯;病毒灭活;高效液相色谱

**Application of - propiolactone in HFRS vaccine** CHEN Wei, LI Zhong-yi, LIU Jiang-qiu, et al. Department of Etiology, the Fourth Military Medical University(Xi'an 710032, China)

**Abstract: Objective** To study the optimal inactivated condition of - propiolactone(BPL) on preparation of hemorrhagic fever with renal syndrome(HFRS) bivalent purified vaccine(vero cells derived). **Methods** The HFRS bivalent purified vaccine was treated with different final concentrations and different time respectively. Residual infectivity was determined by standard viral proliferation assay on tissue culture cells. Using high performance liquid chromatography(HPLC), the optimal condition of hydrolysis of bpl was analyzed and the residual contents of BPL in 3 batches of HFRS bivalent purified and inactivated vaccine were measured. Rabbits immunized with the 3 batches of HFRS bivalent purified and inactivated vaccine were detected the neutralizing antibody titers of sera at 4 weeks after 2 times of immunization. **Results** The HFRS bivalent purified vaccines treated with the final concentration of 1 2 000 and 1 4 000 of BPL for 24 hours were inactivated completely. Under the condition of 37 ℃ water bath, the content of BPL in HFRS vaccine decreased gradually along with the prolongation of time and disappeared completely 2 hours later. Rabbits immunized with the 3 batches of HFRS bivalent purified and inactivated vaccine showed 100% sera conversion and the neutralizing antibody titers of sera against hantaan virus(HTN) and seoul virus(SEO) reached 1 20. **Conclusion** It was feasible and secure for inactivation of HFRS bivalent purified vaccine(vero cells derived) with the final concentration of 1 4 000 of BPL under the conditions of 4 ℃ for 24 hours and then 37 ℃ water bathing for 2 hours. The HFRS bivalent purified vaccine inactivated with BPL possessed good immunogenicity.

**Key words:** hemorrhagic fever with renal syndrome; vaccine; vero cells; - propiolactone; viral inactivation; high performance liquid chromatography

在制备双价 Vero 细胞肾综合征出血热(Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, HFRS)纯化疫苗中,病毒的灭活是整个生产工艺中一个非常重要的环节。- 丙内酯(BPL)是一种杂环化合物,对病毒具有很强的灭活作用,比福尔马林作用强 25 倍,而且对病毒抗原影响或破坏作用较小,其作用机制通过与嘌呤碱基(主要是鸟嘌呤)反应改变病毒核酸结构达到灭活病毒的目的<sup>[1,2]</sup>,同时可以降低生物制品中残留或污染细胞 DNA 的危险,为探讨 BPL 对双价 Vero 细胞 HFRS 纯化疫苗的最佳灭活条件,我们观察了不同终浓度的 BPL 和不同的灭活时间对疫苗的灭活效果。采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)动态分析不同条件下 BPL 的水解情况,对 3 批双价 Vero 细胞 HFRS 纯化

灭活疫苗 BPL 的残留量和动物免疫效果进行研究,为制备双价 Vero 细胞 HFRS 纯化灭活疫苗提供依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 Vero 细胞 来源于 ATCC 129 代由中国药品生物制品检定所提供,经本室传代保存,使用代次不超过 150 代。Vero - E<sub>6</sub> 细胞为本室保存。

1.1.2 H8207 毒株 为 HFRS 汉滩型病毒(hantaan virus, HTN),采用 Vero - E<sub>6</sub> 细胞分离自牡丹江地区采集的早期 HFRS 病人全血(Vero - E<sub>6</sub> 细胞 3 代和小白鼠乳鼠脑 6 代)。

1.1.3 Y86013 毒株 为 HFRS 汉城型病毒(seoul virus, SEO),采用 Vero - E<sub>6</sub> 细胞分离自辽宁省锦西葫芦岛地区捕获的褐家鼠鼠肺标本(Vero - E<sub>6</sub> 细胞 3 代和小白鼠乳鼠脑 6 代)。

1.1.4 HFRS 标准毒株 76 ~ 118 株(HTN)和 UR 株(SEO),由安徽省医学科学研究所提供。

1.1.5 双价 Vero 细胞 HFRS 纯化未灭活疫苗 为 HFRS

作者单位: 1. 第四军医大学基础部病原生物学教研室,西安 710032; 2. 沈阳军区军事医学研究所; 3. 沈阳军区总医院检验科; 4. 黑龙江省哈尔滨市第一医院; 5. 辽宁卫星生物制品研究所  
作者简介: 陈伟(1962 - ),男,吉林省吉林市人,博士,主要从事病原生物学防治研究。

H8207 株(型)和 Y86013 株(型) Vero 细胞培养液,分别经超滤浓缩和 Sepharose 4FF 凝胶柱层析纯化等工艺处理后,将二者合并而得。

1.1.6 3 批双价 Vero 细胞 HFRS 纯化灭活疫苗 制备工艺同上,并经 1 4 000 BPL 4 灭活 24 h,然后 37 水解 2 h。

1.1.7 试剂和仪器 (1) - 丙内酯:Sigma 公司产品(货号:P5648,分子式:C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>)。(2)免疫血清:兔抗 HFRS 76~118 株免疫血清工作效价 1 128;兔抗 HFRS UR 株免疫血清(工作效价 1 64);FITC-羊抗兔 IgG(工作效价 1 32)。免疫血清和荧光抗体均为本室制备。(3)空斑试验(PFT)和空斑减少中和试验(PRNT)所需试剂,参见文献[3]。(4)Waters 高效液相色谱系统:1525 型泵,2487 型检测器和 Breeze 工作站,C<sub>18</sub>柱(4.6 m ×200 mm,5 μ)。 (5)Olympus 荧光显微镜。

## 1.2 方法

1.2.1 色谱条件流动相(甲醇:水=80:20),柱温 25,流速 1.0 ml/min,检测波长 254 nm,上样量 10 μl。

1.2.2 确定双价 Vero 细胞 HFRS 纯化疫苗和 BPL 的出峰时间和峰位 取 10 μl BPL 标样(临用前用纯水 1 4 000 倍稀释配制)和 10 μl 双价 Vero 细胞 HFRS 纯化疫苗(未经 BPL 灭活),分别上样测定出峰时间和峰位。

1.2.3 BPL 最佳灭活剂量和最佳灭活时间的选择及安全试验 将未灭活的双价 Vero 细胞 HFRS 纯化疫苗病毒液,分别加入终浓度为 1 2 000,1 4 000,1 6 000 的 BPL,混合震荡 30 min,置 4 冰箱分别作用 1,2,3,4 和 5 d,然后再分别在 37 水浴中水解 2 h,取样用细胞培养法进行病毒增殖试验。将上述灭活疫苗分别接种 Vero-E<sub>6</sub> 细胞,盲传 3 代,每代 10 d,第 3 代时取细胞刮片进行间接免疫荧光染色(indirect fluorescent antibody test,IFAT)检查 HFRS 病毒抗原,对其灭活效果进行比较。

1.2.4 BPL 最佳水解条件的选择 首先,用终浓度为 1 4 000 BPL 灭活双价 Vero 细胞 HFRS 纯化疫苗(批号:20010301),然后取不同条件(4 0 h,4 24 h,4 24 h+37 1 h,4 24 h+37 2 h 和 4 24 h+37 3 h)作用下的各个样品,采用高效液相法动态测定和分析 BPL 的水解和残留量情况。

1.2.5 3 批双价 Vero 细胞 HFRS 纯化灭活疫苗 BPL 残留量的检测 3 批疫苗经 1 4 000 终浓度 BPL 4 灭活 24 h,然后 37 水解 2 h,采用高效液相色谱法检测其 BPL 残留量。

1.2.6 3 批双价 Vero 细胞 HFRS 纯化灭活疫苗的效力试验 3 批疫苗每一种免疫 4 只大耳白家兔(2~2.5 kg/只,一级标准,购于中国医科大学实验动物中心)。家兔后腿肌肉接种疫苗 2 次,每次 1.0 ml,间隔 2 周,第 2 次接种后 2 周采血并分离血清。每只家兔于免疫前 4 周采血,分离血清作为对照。空斑试验和空斑减少中和试验参见文献[3]进行。HFRS 病毒标准株为 76~118 株(HTN)和 UR 株(SEO)。

## 2 结果

2.1 双价 Vero 细胞 HFRS 纯化疫苗和 BPL 出峰时间及峰位 双价 Vero 细胞 HFRS 纯化疫苗(未经 BPL 灭活)出峰时间为 2.1 min,BPL 出峰时间为 3.4 min,2 峰无重叠,明显分离,表明 BPL 水解变化情况不会受到疫苗峰的影响。

2.2 BPL 最佳灭活剂量和灭活时间的选择 终浓度为 1 2 000 和 1 4 000 的 BPL 均可以完全灭活病毒,而 1 6 000 BPL 则出现不能完全灭活病毒的情况,从生产成本和灭活周期考虑,选择 BPL 最佳灭活条件是:BPL 终浓度为 1 4 000,4 灭活 24 h。

2.3 BPL 最佳水解条件的选择 BPL 在 4 条件下水解量很少,而在 37 条件下,随着水解时间的延长,疫苗中 BPL 含量逐渐下降,水解 2 h 以后则无 BPL 检出。

2.4 3 批双价 Vero 细胞 HFRS 纯化灭活疫苗 BPL 残留量的检测 根据双价 Vero 细胞 HFRS 纯化疫苗标样保留时间为 2.1 min,而 BPL 标样保留时间为 3.4 min 进行判定,3 批疫苗中不存在 BPL。

2.5 3 批双价 Vero 细胞 HFRS 纯化灭活疫苗的效力试验 3 批疫苗能在家兔体内诱导产生针对 HFRS 病毒 HTN 型和 SEO 型的中和抗体,其效价均 1 20。

## 3 讨论

由于采用 - 丙内酯(BPL)灭活疫苗具有灭活效果好,对保护性病毒抗原影响或破坏作用较小,残留 - 丙内酯易于水解去除及能破坏污染或残留的基质细胞 DNA(如超过传代限度的 Vero 细胞仍然可以癌变)等优点,因此,这是一种更为安全和可靠的灭活方法。目前,国内外已有多种疫苗采用 - 丙内酯进行灭活。

本研究探讨了 - 丙内酯对双价 Vero 细胞 HFRS 纯化疫苗的最佳灭活条件,为制备该类疫苗提供依据。结果显示,双价 Vero 细胞 HFRS 纯化疫苗采用终浓度为 1 4 000 - 丙内酯,4 灭活 24 h,然后再于 37 水解 2 h,可以达到完全灭活病毒并无 - 丙内酯残留的标准。3 批采用上述条件灭活的双价 Vero 细胞 HFRS 纯化疫苗,均未检出 - 丙内酯残留,而且,疫苗仍保持良好的免疫原性,效力试验均达到《中国生物制品规程》<sup>[4]</sup>要求。因此,可以认为 - 丙内酯是一种更为安全、可靠和省时的病毒灭活剂,适用于 HFRS 疫苗的灭活。

## 参考文献:

- [1] Lawrence SA. - propiolactone: Viral inactivation in vaccines and plasma products[J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2000, 54: 209 - 217.
- [2] Perrin P, Morgeaux S. Inactivation of DNA by beta - propiolactone [J]. Biologicals, 1995, 23(3): 207 - 211.
- [3] 中国药品生物制品检定所. 流行性出血热疫苗免疫和免疫效果检测方法[C]. 国家继续医学教育项目讲义, 1998, 1 - 11.
- [4] 中国生物制品标准化委员会. 《中国生物制品规程》[M]. 2000 年版. 北京: 化学工业出版社, 2000. 165 - 169.

收稿日期: 2002-12-05

(蔡天德编辑 郭长胜校对)