·生物医药前沿·

F 基因型腮腺炎减毒活疫苗(人二倍体细胞)SP-A 株工作种子批的建立与检定

邱　恒,田文志,王　微,郑俊杰,任芳芳,段颖融,李琦涵,王晶晶
(中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所,云南省重大传染病疫苗研发重点实验室,昆明 650118)

[摘要]　**目的:**以人二倍体细胞 KMB-17 株为细胞培养基质建立 *F* 基因型腮腺炎减毒活疫苗 SP-A 株工作种子批。**方法:**在细胞工厂中以血清浓度为 5% 的 MEM 培养基培养 KMB-17 细胞,待细胞生长至单层后,分别按照 0.020,0.050 和 0.100 感染复数(multiplicity of infection,MOI)的比例接种病毒,逐日检测病毒滴度,绘制病毒增殖动力曲线以确定最适 MOI 和最佳收获时间。制备工作种子批,测定其病毒滴度及热稳定性,同时进行鉴别实验、无菌检查、分枝杆菌检查、支原体检查、病毒外源因子检查和小疏水蛋白(small hydrophobic protein,SH)核酸序列检查。利用该工作种子制备 3 批病毒收获液和疫苗原液并进行相关质量检定。**结果:**根据病毒增殖动力曲线,确定工作种子批的最适 MOI 为 0.020,接种后 d 7 为病毒最佳收获时间,按此条件制备了工作种子批并完成检定,结果符合《中华人民共和国药典》2020 年版三部腮腺炎减毒活疫苗毒种制造及检定质量要求。利用该工作种子批制备了 3 批病毒收获液和疫苗原液,经检定均符合《中华人民共和国药典》2020 年版三部病毒收获液和原液的制造及检定规程要求。**结论:**建立 *F* 基因型腮腺炎减毒活疫苗 SF-A 株工作种子批,为后续 *F* 基因型腮腺炎减毒活疫苗的产业化提供了支持。

[关键词]　腮腺炎疫苗;工作种子;生产工艺;检定
[中图分类号]　R927;R512.1　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003 - 3734(2021)15 - 1381 - 05

Establishment and quality control of working virus seeds of *F*-genotype attenuated mumps vaccine SP-A strain (human diploid cell)

QIU Heng, TIAN Wen-zhi, WANG Wei, ZHENG Jun-jie, REN Fang-fang,
DUAN Ying-rong, LI Qi-han, WANG Jing-jing
(*Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases, Kunming* 650118, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To establish the working virus seeds of *F*-genotype attenuated mumps vaccine SP-A strain in human diploid cells KMB-17. **Methods**: In cell factory, KMB-17 cells were cultured in MEM medium with 5% newborn bovine serum. After the cells grew to monolayer, the virus was inoculated into 0.020, 0.050 and 0.100 multiplicity of infection(MOI), respectively, in KMB-17 cells. The virus titer was detected everyday, and the optimal MOI and harvest time were determined from the dynamic proliferation curve of virus. The working virus seeds were prepared, the virus titer and thermal stability were determined. Identity, sterility, Mycobacterium Mycoplasma, Adventitious virus and small hydrophobic protein (SH) nucleic acid sequence test were carried out on the working virus seeds. Three batches of experimental vaccine virus harvest and bulk were prepared by using the working virus seeds, and relevant quality control was carried out. **Results**: According to the dynamic proliferation curve of virus, optimistic MOI was determined as 0.020, and the best harvest time was 7 days after inoculation. The working virus seeds were prepared according to the optimized procedure. The working virus seeds and three

[基金项目]　中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目(2016-12M-1-019);云南省科技人才和平台计划资助项目(2019HB073)
[作者简介]　邱恒,女,技师,主要从事病毒疫苗中试开发。E-mail:824138305@qq.com。
[通讯作者]　王晶晶,女,副主任技师,主要从事病毒疫苗产业化研究。E-mail:wangjingjing@imbcams.com.cn。

batches of experimental vaccine virus harvest and bulk met the requirements of "Chinese Pharmacopoeia" (Volume Ⅲ, 2020 edition). **Conclusion**: The results established procedure of working virus seeds of *F*-genotype attenuated mumps vaccine SP-A strain, and these data support the subsequent large-scaled preparation of *F*-genotype attenuated mumps vaccine.

[**Key words**] mumps vaccine; working virus seeds; culture procedure; quality control

流行性腮腺炎是由腮腺炎病毒引起的一种急性传染性疾病[1],从国家卫生健康委员会疾病控制局公布的2019年全国法定传染病疫情概况来看,流行性腮腺炎报告发病数居丙类传染病的第4位,发病总数为299 961例,发病率为21.48/10万[2]。尽管我国自20世纪90年代开始已将流行性腮腺炎纳入国家免疫规划中,但其发病率却呈逐年递增的态势,使得人们开始关注该疫苗的免疫保护效果[3]。

目前国内广泛使用腮腺炎减毒活疫苗毒株主要是*A*基因型,但根据腮腺炎流行病学资料,以及对我国腮腺炎患者的基因学分析发现,大部分患者感染的病毒主要为*F*基因型[4]。因此,在腮腺炎病毒疫苗研制与使用中,使用与流行毒株基因型一致的腮腺炎病毒毒株将对控制流行性腮腺炎的发病率起到重要作用[5]。

本研究使用第23代*F*基因型腮腺炎减毒活疫苗SP-A株毒种接种于人二倍体细胞KMB-17制备了工作种子批,为后续规模化制备*F*基因型腮腺炎减毒活疫苗提供了数据支持。

材料与方法

1 细胞、毒种及抗体

人二倍体细胞(human diploid cell)KMB-17株和抗腮腺炎病毒兔多克隆抗体由中国医学科学院医学生物学研究所提供,用于毒种制备的细胞代次不超过28代,用于疫苗原液制备的细胞代次不超过32代。腮腺炎病毒(mumps virus)SP-A株为中国医学科学院医学生物学研究所于2005年分离,经全基因测序为*F*基因型(基因库登录号:DQ 649478),制备工作种子和疫苗原液所使用的毒种为:SP-A株原始种子批为第18代,主种子批为第20代,工作种子批为第24代。主种子批用于制备工作种子批,工作种子批用于疫苗生产。

2 主要仪器设备

Symbio－3集菌仪(美国默克密理博公司);ISOLATOR－01无菌隔离器(上海东富龙爱瑞思科技有限公司);细胞工厂、T25、T225细胞培养瓶和96孔培养板(美国康宁公司,目录号依次为:7160,430639,431081,9018,批号依次为:23819601,06519601,02420002,05719001);A24812和2720聚合酶链式反应仪(PCR,美国ABI公司);3111二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);DMIL显微镜(德国Leica公司);PY330无菌检查用培养箱(重庆雅马拓科技有限公司)。

3 主要材料

MEM培养基(美国Gibco公司,批号:2153234);新生牛血清(兰州民海生物工程有限公司,批号:20190409);硫酸卡那霉素(遂成药业股份有限公司,批号:71812111,规格:0.25 g·mL^{-1});胰蛋白酶(胰酶)和谷氨酰胺(美国Sigma公司,胰酶批号:SLCC2819,谷氨酰胺批号:SLBX8887);0.01 mol·L^{-1} PBS(中国医学科学院医学生物学研究所配制,批号:2020-09-F-01);无菌检查用培养基(北京三药科技开发公司,其中硫乙醇酸盐流体培养基,批号:20191108,胰酪大豆胨液体培养基,批号:20191203);核酸提取试剂盒、逆转录和PCR试剂盒(大连TaKaRa公司,依次为MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0,批号:AK41821A,PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit,批号:AJF1798A和Premix Taq™ Version 2.0 plus dye,批号:AJ60430A)。

4 实验动物

雌性Balb/c小鼠,SPF级,6~8周龄,体重17~20 g,乳鼠,出生后24 h内,清洁级,由中国医学科学院医学生物学研究所提供,动物合格证号:SYXK(滇)K2019-0003。

5 细胞传代与计数

在细胞工厂中将已生长至单层的人二倍体细胞KMB-17株,用0.125%胰酶消化15~20 min,分散均匀后,按照1∶4的比例连续传代,每次传代时在含有5%新生牛血清条件下,于37 ℃培养4 d,镜下观察细胞生长成致密单层后,进行细胞计数,细胞数量应不小于5.0×10^{8}·mL^{-1},可用于工作毒种制备。

6 病毒增殖动力学检测

使用血清浓度为5%的MEM培养基扩增KMB-

17 细胞,待细胞生长至单层后,按照感染复数(multiplicity of infection,MOI) 0.020,0.050 和 0.100 将病毒分别接种于细胞中,以不含血清的培养基进行维持,接种病毒后每天观察细胞病变情况,并收集样品检测病毒滴度,待细胞病变到 70% ~80% 收集上清。

7 病毒收获液、原液制备

待细胞长成单层后,弃去培养液,洗涤细胞时每个细胞工厂用 1 000 mL 0.01 mol·L^{-1} PBS 清洗细胞,摇晃 4 ~6 次,弃去洗液,浸泡细胞时再加入 1 000 mL 0.01 mol·L^{-1} PBS,浸泡细胞面至少 10 min,弃去洗液,按照此过程重复 2 次。清洗细胞表面后,使用工作毒种连续制备 3 批疫苗原液,按照 0.020 MOI 接种细胞,于 37 ℃培养 7 d,收集样品后为病毒收获液,经过 50 和 10 μm 这 2 级澄清过滤后,即为疫苗原液。

8 病毒滴度检测

病毒滴定采用微量细胞病变法。将样品做 10 倍系列稀释,取至少 3 个稀释度病毒液接种 KMB-17 细胞,每稀释度接种 8 孔,0.10 mL·$孔^{-1}$,置于(37 ± 0.5) ℃培养 10 d 判定结果。热稳定性实验将样品在 37 ℃条件下,放置 7 d 后检测病毒滴度。

通过 Karber 法计算病毒滴度($lgCCID_{50}·mL^{-1}$) = 全病变最高稀释度的负对数 + 未全病变各稀释度病变孔数之和 ×0.125 +0.5 +1.0。

9 鉴别实验

将样品稀释至 1 000 $CCID_{50}·mL^{-1}$,与稀释好的抗腮腺炎病毒血清混合后,置于 37 ℃水浴中孵育 60 min 后,接种于 KMB-17 细胞,同时设血清对照、细胞对照及不加血清的病毒对照,置于 37 ℃、5% CO_2 恒温箱中培养 10 d 后判定结果。腮腺炎病毒应被完全中和无细胞病变,血清对照和细胞对照均应为阴性,病毒对照滴度应不小于 500 $CCID_{50}·mL^{-1}$。

10 无菌、分枝杆菌和支原体检查

按照《中华人民共和国药典》2020 年版三部要求进行,无菌检查按照通则 1101,分枝杆菌检查按照各论,支原体检查按照通则 3301。

11 病毒外源因子检查

取待检样品稀释至 4.50 $lgCCID_{50}·mL^{-1}$ 后,与抗腮腺炎病毒血清等量混合,置于 37 ℃、5% CO_2 中和 1 h,后续操作按照药典通则 3302 要求进行。

12 *SH* 序列测定

SH 基因是腮腺炎病毒基因型的分型标准,根据 SP-A 株序列中 *SH* 基因(Genbank:DQ649478)设计引物序列,*SH1*:5' TCAACACAATATCAAGlA 3'(6 119 ~ 6 136),*SH2*:5' TTCTGlATTGTGTTGTG 3'(6 573 ~6 556)。核酸提取按照 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0 说明书操作,逆转录 PCR 按照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书操作,获得 cDNA 后按照 Premix Taq™(TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye)说明书进行 *SH* 全基因扩增,目的片段全长 454 bp。目的片段测序后,用 DNAMAN 软件进行序列比对。

13 统计分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据统计采用 GraphPad Prism 5.0 软件。

结 果

1 工作毒种增殖动力曲线

利用细胞工厂在 5% 浓度的血清条件下培养人二倍体细胞,在无血清培养条件下选取 0.020,0.050 和 0.100 MOI 3 种接种细胞,逐日观察病毒增殖情况。结果显示 0.020 MOI 接种细胞后,病毒的增殖峰值出现在 5 ~7 d,至 d 7 时到达 6.65 $lgCCID_{50}·mL^{-1}$,随后开始缓慢下降;0.050 MOI 出现增殖时间与 0.020 相似,但其病毒滴度均低于 0.020,d 7 时最高能到 6.00 $lgCCID_{50}·mL^{-1}$;0.100 MOI 出现病毒峰值时间最早,在 d 5 时病毒滴度 6.35 $lgCCID_{50}·mL^{-1}$,但随后呈现迅速下降,至 d 9 时病毒滴度已降至 5.20 $lgCCID_{50}·mL^{-1}$。经过比较后,在制备工作毒种时,0.020 MOI 病毒增殖较稳定,因此将其设定为制备工作毒种的最适 MOI,接种后 d 7 为病毒收获时间,详见图 1。

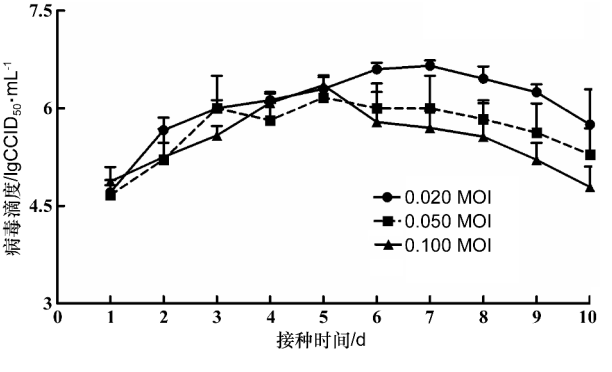


图 1 3 种 MOI 比例下病毒增殖动力曲线

2 病毒滴度变化

在以上述确定的 MOI 和最佳收获时间为培养条

件,制备了工作毒种,以及使用该毒种连续 3 批病毒收获液和原液,并对其热稳定性实验进行了观察,实验结果显示工作毒种的病毒滴度为 6.62 $lgCCID_{50}\cdot mL^{-1}$,热稳定性实验下降 0.62 $lgCCID_{50}\cdot mL^{-1}$,在以该毒种制备的病毒收获液和原液滴度均值不低于 6.62 $lgCCID_{50}\cdot mL^{-1}$,热稳定实验结果均不低于 6.00 $lgCCID_{50}\cdot mL^{-1}$,见表 1。

表 1 工作毒种及连续 3 批制备病毒收获液和原液病毒滴度变化 $lgCCID_{50}\cdot mL^{-1}$

批次	收获液	原液	热稳定实验
工作种子	6.62	6.62	6.00
第 1 批	6.62	6.50	6.00
第 2 批	6.62	6.50	6.00
第 3 批	6.87	6.62	6.12

3 *SH* 核酸序列检查

SH 基因是腮腺炎病毒的主要分型的基因,实验对所制备工作毒种的 *SH* 基因进行了扩增,工作毒种病毒 *SH* 基因核苷酸无改变,与 *F* 基因腮腺炎病毒(GenBank 登录号:DQ649478)比对结果显示,工作毒种 *SH* 基因核苷酸与原始毒种同源性达 100%。

4 工作种子及疫苗原液相关检定

鉴别实验结果显示,工作种子和病毒原液可被抗腮腺炎病毒血清完全中和,无细胞病变出现,进一步对工作种子进行无菌检查、分枝杆菌检查、支原体和病毒外源因子检查,检测结果均符合《中华人民共和国药典》2020 年版三部标准,其中无菌检查和支原体检查结果为阴性,分枝杆菌检查、病毒外源因子检查结果合格。利用该工作种子批制备的病毒收获液无菌检查和支原体检查为阴性,疫苗原液无菌检查亦为阴性,见表 2。

表 2 工作种子及 3 批制备病毒原液检定结果

样品类型	检定项目	检定结果
工作毒种	鉴别实验	合格
	无菌检查	阴性
	分枝杆菌	合格
	支原体检查	阴性
	病毒外源因子	合格
病毒收获液	无菌检查	阴性
	支原体检查	阴性
疫苗原液	无菌检查	阴性

讨 论

目前大部分腮腺炎疫苗是在鸡胚细胞中培养制备,不但能保留较好的免疫原性,其安全性也已得到证实[6]。我国也有应用二倍体细胞制备腮腺炎疫苗的报道[7]。中国医学科学院医学生物学研究所多年来一直从事国内腮腺炎流行毒株的分析和腮腺炎减毒活疫苗的研究工作。2005 年流行性腮腺炎暴发中,自患儿口漱液标本中分离了 *F* 基因型的腮腺炎病毒 SP-A 毒株并进行了全面研究[8]。目前,以该毒株制备的疫苗已经完成了Ⅰ期和Ⅱ期临床试验,证明了其良好的免疫原性和安全性[9-10]。

本实验在前期工作的基础上,进一步优化了 *F* 基因型腮腺炎病毒 SP-A 株工作种子的制备工艺,并使用该种子批制备疫苗。筛选出适合以人二倍体细胞作为生产基质,细胞工厂作为培养容器的生产条件,本研究通过观察不同 MOI 条件下病毒增殖的情况,确定了工作种子批最适 MOI 为 0.020,最佳收获时间为接种病毒后 d 7,从而建立了该疫苗的工作毒种库。对该种子批和病毒收获液和疫苗原液进行了相关检定,结果显示,工作种子无菌实验、分枝杆菌、支原体检查和外源因子检查均符合《中华人民共和国药典》2020 年版三部规定[11];鉴别实验中用抗腮腺炎病毒血清中和腮腺炎病毒,无细胞病变发生;同时提取 *F* 基因型腮腺炎病毒核酸,用 *SH* 基因特异性引物进行 PCR 扩增,测序结果表明核苷酸序列与原始毒株同源性达 100%,表明所建立的毒种为 *F* 基因型腮腺炎毒种。

一般认为在毒种阶段获得较高的滴度,将有利于后续疫苗滴度的稳定[12]。研究中制备的工作毒种的病毒滴度为 6.62 $lgCCID_{50}\cdot mL^{-1}$,热稳定性实验下降 0.62 $lgCCID_{50}\cdot mL^{-1}$,在建立工作种子库的基础上,按照毒种制备的条件,进一步制备了收获液和原液,并对其进行病毒滴定。病毒收获液的滴度稳定在 6.50 ~ 6.75 $lgCCID_{50}\cdot mL^{-1}$之间,经过二级过滤后,以该毒种制备的疫苗原液病毒滴度均值不低于 6.50 $lgCCID_{50}\cdot mL^{-1}$,热稳定实验结果均不低于 6.00 $lgCCID_{50}\cdot mL^{-1}$。结果表明病毒收获液和疫苗原液滴度均不低于工作种子,使用该工艺制备的工作种子批可以用于后续疫苗规模化的制备。此外由于腮腺炎病毒的不稳定性,还需要重点观察工作种子批的长期稳定性,本课题组也将继续开展这方面的工作。

综上所述,本实验在细胞工厂中建立了 *F* 基因型腮腺炎病毒(人二倍体细胞)工作种子库,并按照《中华人民共和国药典》三部要求进行了检定,为制备以人二倍体细胞为基质的 *F* 基因型腮腺炎减毒活疫苗规模化生产提供了技术支持和理论依据。

[参 考 文 献]

[1] BOCKELMAN C, FRAWLEY TC, LONG B, *et al*. Mumps: an emergency medicine-focused update[J]. *J Emerg Med*, 2018, 54(2): 207 - 214.

[2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会疾病预防控局. 2019 年全国法定传染病疫情概况,2019[EB/OL]. [2020 - 04 - 20]. http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3578/202004/b1519e1bc1a944fc8ec176db600f68d1.shtml.

[3] 蒋蕊鞠, 殷琼洲, 徐明珏, 等. 2004—2018 年全国流行性腮腺炎发病特征及重点防控人群分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2019,21(5): 441 - 444.

[4] LIANG Y, CHE YC, YANG BF, *et al*. Immunogenicity and safety of an F-genotype attenuated mumps vaccine in healthy 8- to 24-month-old children[J]. *J Infect Dis*, 2019, 219(1): 50 - 58.

[5] 崔爱利. 中国腮腺炎病毒血凝素神经氨酸酶分子进化及其对疫苗保护效果影响[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2017.

[6] 付永其,金珏艳,张颖欣,等. 新生牛血清的质量控制对 SPF 鸡胚细胞和人二倍体(2BS)细胞生长的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2018,31(11): 1182 - 1187.

[7] 王微,邱恒,杨振清,等. 细胞工厂中 *F* 基因型腮腺炎病毒 SP-A 株在人二倍体细胞上的增殖研究[J]. 微生物学免疫学进展,2020,48(1): 63 - 68.

[8] 史长军,梁燕,崔萍芳,等. 不同代次 *F* 基因型 SP-A 株腮腺炎病毒在恒河猴体内的致病性[J]. 中国生物制品学杂志, 2008,21(9): 774 - 776.

[9] 殷琼洲,夏龙辉,李菁,等. 8 ~ 24 个月龄儿童腮腺炎病毒血清学抗体检测方法比较分析[J]. 医学研究杂志,2018,47(10): 49 - 53.

[10] LIANG Y, MA JC, LI CG, *et al*. Safety and immunogenicity of a live attenuated mumps vaccine: a phase I clinical trial[J]. *Hum Vacc Immunother*, 2014, 10(5): 1382 - 1390.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 三部. 北京: 中国医药科技出版社,2020.

[12] 刘辉,孙雅,王刚,等. 腮腺炎减毒活疫苗工作代毒种工艺优化[J]. 中国生物制品学杂志,2018,31(10): 1130 - 1134.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 03 - 15