

人二倍体细胞狂犬病疫苗研究进展

刘瑾¹, 董关木²

1.北京大学第一医院,北京 100034;2.原中国药品生物制品检定所

摘要: 狂犬病是一种人兽共患的病毒性传染病,在全球分布广泛,给人类健康带来巨大威胁。狂犬病是一种疫苗可预防疾病,其中人二倍体细胞狂犬病疫苗(human diploid cell vaccine, HDCV)是目前国际公认的安全性及免疫原性最好的狂犬病疫苗。随着科技的进步,疫苗的生产工艺在不断的发展创新,国产HDCV通过生物反应器微载体培养工艺培养人二倍体细胞,采用层析纯化工艺对疫苗进行纯化,提高了疫苗的质量指标,为人类抵抗狂犬病提供更安全、有效的防控手段。本文从HDCV的培养工艺、纯化工艺、临床安全性和免疫原性等方面,对HDCV进行分析评述。

关键词: 狂犬病;疫苗;人二倍体细胞;安全性;免疫原性

中图分类号: R256 **文献标识码:** B **文章编号:** 1673-6966(2018)11-1117-04

狂犬病是由狂犬病病毒引起的人兽共患传染病,所有的哺乳动物均被认为对该病易感^[1]。狂犬病病毒主要经破损的皮肤或者黏膜侵入机体,人发病后死亡率几乎100%^[2-4]。目前全球150多个国家与地区存在此病^[5],每年因狂犬病导致的死亡人数估计为59 000^[6-7]。狂犬病是疫苗可防控疾病,开发安全、高效的狂犬病疫苗意义重大^[8,9]。中国目前使用的狂犬病疫苗为纯化Vero细胞疫苗(purified Vero cell rabies vaccine, PVRV)、原代地鼠肾细胞疫苗(primary hamster kidney cell vaccine, PHKCV)、纯化鸡胚细胞疫苗(purified chicken embryo cell vaccine, PCECV)、人二倍体细胞狂犬病疫苗(human diploid cell vaccine, HDCV),其中HDCV在欧洲及北美应用40多年,已证实是安全高效的^[10],是国际公认的金标准狂犬病疫苗^[11],常作为新研发狂犬病疫苗的标准对照疫苗^[11,12]。目前全球仅两家公司生产销售HDCV,分别为法国赛诺菲巴斯德公司和成都康华生物制品股份有限公司。国产HDCV采用的细胞与病毒株均与法国赛诺菲巴斯德公司HDCV相同,但疫苗制备工艺改进,疫苗安全性和免疫原性良好^[13,14]。本文从HDCV的培养工艺、纯化工艺、临床安全性、免疫原性和持久性等方面,对HDCV进行分析评价。

1 HDCV毒种与人二倍体细胞概述

1.1 HDCV毒种 1882年,法国科学家巴斯德及其同事成功从疯牛脑内分离出狂犬病病毒,经兔脑传代获得一株固定毒,即为巴斯德株^[15]。PV株源于巴斯德株,1940年Hable将PV株引入美国,Wistar研究所从

美国国立卫生研究院(NIH)获得PV-11株。1962年,美国Wistar研究所率先开展HDCV的立项研究,将狂犬病病毒Pitman-Moore L503M株在人二倍体细胞系WI-38细胞株适应传代,将52代毒种Pitman-Moore L503M株制成生产用毒种。随后,美国Wistar研究所将毒株分别转让给法国Merieux研究所和德国Berhring厂。1967年,美国Wistar研究所首次研制成功HDCV。法国Merieux研究所经过技术改进,将Wistar株在人二倍体细胞系MRC-5细胞株适应传代,病毒种子为第16代,生产用细胞为第27代,并于1974年在法国首次获得生产许可证。1977年,HDCV在欧洲和北美正式上市。德国Berhring厂同样将Wistar株在人二倍体细胞系MRC-5细胞株适应传代,于1978年获得HDCV生产许可^[14,16,17]。

国产HDCV采用狂犬病病毒PM株,并获得国家药品监督管理局批准^[18]。

1.2 人二倍体细胞 细胞基质质量优劣将直接影响疫苗的质量与产量,特别是疫苗的安全性^[19]。人二倍体细胞来源于胎儿,为正常核型细胞,有正常二倍体染色体的数目;在培养条件下,不能无限期的分裂繁殖,为有限细胞系;无异种移植致癌性,保留原体内细胞特性。常见的二倍体细胞为WI-38、IMR-90、MRC-5、KMB-17等。20世纪60年代,美国Wistar研究所进行了一系列人胚胎二倍体细胞建株培养工作^[20],并选择WI-38细胞株进行了狂犬病病毒的培养,这是人胚胎二倍体细胞首次用于病毒疫苗研究。1967年NIH组织的会议同意将人胚胎二倍体细胞用于病毒疫苗的生产^[21]。近几十年,人二倍体细胞已被广泛应

用于人类多种病毒性疫苗生产,多项研究已证实其是安全的细胞基质^[22, 23]。利用人二倍体细胞所制得的疫苗的安全性较高^[24]。国产 HDCV 的细胞基质是 WHO 认可并推荐的 MRC-5 细胞株。目前为止, MRC-5 细胞被世界各地多个疫苗生产厂家用于多种疫苗生产^[25, 26]。目前人二倍体细胞培养难度大,产量低,成本高,仅限于部分国家使用^[27]。

2 HDCV 生产工艺、质量标准、安全性、免疫原性概述

2.1 HDCV 生产工艺

2.1.1 国外 HDCV 生产工艺。法国 HDCV 生产工艺流程为,利用细胞工厂培养人二倍体细胞;利用微孔过滤去除杂质;超滤浓缩;浓缩物用β-丙内酯灭活后再过滤,加冻干保护剂后冻干制成疫苗。也可通过蔗糖梯度密度区带离心法进行疫苗纯化,然后再灭活与超滤浓缩,经适当的稀释后加保护剂进行冻干制成疫苗^[14]。

2.1.2 国产 HDCV 生产工艺。国产 HDCV 生产工艺流程为,利用生物反应器微载体培养人二倍体细胞;在 MRC-5 细胞上接种 PM 毒株;收获病毒液;超滤浓缩,利用分子筛柱层析纯化疫苗原液;β-丙内酯灭活病毒;配置形成半成品;再分装冻干制成疫苗。

生物反应器微载体培养技术提高了人二倍体细胞培养规模,降低了 HDCV 疫苗批次间的差异,保证了疫苗质量的稳定性和均一性。通过分子筛柱层析进行纯化,可有效去除杂质^[24, 28-30]。此外,国产 HDCV 对冻干过程中稳定剂和保护剂的组分和冻干工艺进行了优化。国产 HDCV 在物理形态上有质量分数为 92.0% 以上的疏松体,且溶解时间为 95~99 s。国产 HDCV 热稳定性和效价稳定性良好^[31]。

2.2 HDCV 质量标准 国产 HDCV 质量控制依据为企业注册标准和国家药典^[32],见表 1。国产 HDCV 质量标准高,是良好免疫效果的基础^[33]。

2.3 HDCV 安全性 HDCV 同样存在不良反应问题。

HDCV 在美国应用后,开始出现过敏反应报告,主要发生在加强免疫后^[34, 35]。不良反应总发生率为 0.11%,但是加强免疫后提高到 6%^[36]。一项超过 1 770 例受试者的安全性研究报道严重上臂疼痛发生率 15%~25%,头痛发生率 5%~8%,不适、恶心或两者兼有发生率 2%~5%,过敏性水肿发生率 0.1%^[28]。过敏反应类型主要为 1 型(IgE)、3 型(IgG-IgM),研究显示这是由疫苗中存在的人白蛋白的抗原性引起的^[37]。

国产 HDCV 的Ⅲ期临床试验中,600 人接种国产 HDCV 共 3 000 剂次,对接种后不良反应发生情况进行观察与统计后发现,局部不良反应发生率是 7.67%,大多数的局部反应发生在第 1 与第 2 剂疫苗接种之后,主要是接种部位疼痛与红肿。全身总不良反应发生率为 5%,无论局部或者全身反应均是轻微反应,无Ⅲ级与Ⅲ级以上不良反应的发生,并且所有受试者的不良反应均在 72 h 内自行恢复。此次临床观察的结果表明,国产 HDCV 不良反应轻微,具有良好的安全性^[13, 38]。

儿童缺乏自我保护意识,犬伤门诊就诊的婴幼儿及儿童患者有增多趋势^[39]。2016 年,许靖等^[40]观察国产 HDCV 用于不同年龄人群的安全性,将受试者按照年龄大小分为儿童组、普通组与老人组,结果显示所有受试者接种疫苗后反应轻微,均未出现Ⅲ级及以上不良反应,所有不良反应均在 72 h 内消除。儿童组、普通组和老年组局部不良反应的发生率分别是 7.46%、7.14% 和 7.69%;儿童组、普通组和老年组全身不良反应的发生率分别是 2.98%、3.76% 和 2.56%。各组间局部和全身不良反应发生率差异无统计学意义。国产 HDCV 接种后,总不良反应发生率较低,儿童和老人发生不良反应的情况和普通人群相当^[40]。2018 年,闫玉英等^[41]观察各年龄段人群接种 HDCV 的不良反应发生情况,以石家庄市疾病预防控制中心国产 HDCV 接种者为观察对象,结果显示接种人数共计 1 040 人,发生不良反应人数共计 9 人,未发生Ⅲ级以

表 1 人二倍体细胞狂犬病疫苗质量标准比较

项目	检定项目	国外 HDCV	国产 HDCV
疫苗有效性保障检测项目	鉴别试验	特异的免疫学方法做鉴别	EIA 法确认含狂犬病病毒抗原
	出厂标准	出厂标准≥2.5IU/剂	出厂标准≥4.0IU/剂
	热稳定性	无检测要求	冻干:37℃×28 d 效价仍≥2.5IU/剂
疫苗有效性/安全性双相关性项目	装量	无检测要求	冻干:作装量差异
	外观	无检测要求	按规定要求检验
	pH	无检测要求	7.2~8.0
	硫柳汞	无检测要求	未添加
疫苗安全性检测项目	抗生素残留	<150μg/剂	未添加
	异常毒性	无检测要求	5 只小鼠,2 只豚鼠全部健全
	宿主细胞蛋白残留	10mg/剂	80μg/剂

上不良反应,不良反应率低至 0.87%。所有不良反应均为轻微反应,在 48 h 内自动恢复。不同组别的不良反应发生率中,与青壮年组 0.59% 的发生率相比,婴幼儿组 1.48%、少儿组 0.53%、老人组 1.43%,差异无统计学意义。

2.4 HDCV 的免疫原性 HDCV 在美国、泰国、印度、伊朗等进行了大范围免疫效果观察^[42-45]。结果表明,HDCV 与其他狂犬病疫苗相比,有更好的免疫原性^[23]。

接种国产 HDCV 后机体能迅速产生高水平狂犬病病毒中和抗体(rabies virus neutralizing antibody, RVNA)^[13, 46]。2009 年,由江苏省疾病预防控制中心完成国产 HDCV Ⅲ期临床试验,共纳入 1 200 例 10~60 岁高危狂犬病感染人群,随机分组,其中 600 例按照暴露后免疫方案接种 HDCV。临床试验结果显示,受试者首针免疫后第 14 天,抗体阳转率为 100%,RVNA 几何平均滴度(geometric mean titer, GMT)是阳转标准的 40 倍;接种 5 针后,GMT 为阳转标准的 75 倍^[13, 46]。2015 年,蔡勇等^[13]观察国产 HDCV 免疫原性,将高危狂犬病感染的健康受试者随机分为试验组与对照组,试验组接种国产 HDCV,对照组接种进口 PVRV,试验组和对照组首剂免疫后第 7、14、42 天的抗体阳转率、血清 RVNA 的 GMT 值差异均无统计学意义。2017 年,在河南省兰考县发生的一起一犬伤多人事件中,13 人被同一犬只咬伤,均为Ⅲ级暴露,其中一人伤及头颈部位。经过对犬脑组织进行检验确定该肇事犬为狂犬病犬。13 人均接种国产 HDCV,全程免疫后第 15 天检测血清 RVNA,最低者 17.82 IU/mL,GMT 值 44.95 IU/mL,全程接种后半年再次检测血清 RVNA,最低者 4.51 IU/mL,GMT 值 19.44 IU/mL。随访 6 个月,所有暴露者均未发病^[47]。

HDCV 免疫持续时间长,记忆性应答好。使用 HDCV 和 PVRV 暴露前免疫 1 年后进行加强,HDCV 组的 RVNA 的 GMT 值为 50.70 IU/mL,远高于 PVRV 组的 13 IU/mL^[48]。HDCV、PCECV 和 PVRV 免疫效果比较显示首剂接种后第 35、100 和 1 114 天 HDCV 组 RVNA 水平更高,HDCV 组加强 1 剂后 RVNA 水平上升近 40 倍^[49]。使用 HDCV 进行 3 针法暴露前免疫,1 年后加强 1 剂,可产生至少 10 年的保护,10 年后再加强注射 1 剂,RVNA 的 GMT 值迅速上升至 53.6 IU/mL^[50]。1975~1976 年,在伊朗 45 例被狼和狗严重咬伤者接种 HDCV,全部存活。32 年后,随访到的其中 26 例 RVNA 水平为 0.3~2.69 IU/mL,当中有 17 例在 28 年前接受过 1 剂 HDCV 加强,有 9 例 32 年间从未进行过任何狂犬病疫苗加强,这 9 例进行 1 剂 HDCV 加强后均

产生记忆性免疫应答^[51]。

2018 年,朱加宏等^[52]观察国产 HDCV 免疫 8 年后加强免疫的效果,选取参加过国产 HDCV 临床Ⅲ期全程免疫对象 60 例,在初次免疫 8 年后进行单剂加强免疫。在加强免疫前和加强免疫后第 14 天分别采集血清,检测 RVNA。54 例受试者完成随访和 RVNA 检测,加强免疫前和加强免疫后 RVNA 的 GMT 值为 1.42 IU/mL、30.61 IU/mL,显示国产 HDCV 免疫 8 年后单剂加强免疫效果良好^[52]。

3 展 望

我国是狂犬病高发国家,消除狂犬病是整个社会的责任,狂犬病疫苗是人类战胜狂犬病最主要的武器^[23]。近年来,我国的狂犬病疫苗质量得到了飞速发展。国产 HDCV 质量控制和产品关键指标已处于较高水平,提高了疫苗的免疫效果和安全性。国产 HDCV 短期免疫效果和 8 年免疫持久性研究结果显示免疫效果良好。从医疗费用方面来看,国产 HDCV 价格远低于国外 HDCV。

国产 HDCV 推动了国内狂犬病疫苗产品更新换代。当前国产 HDCV 临床应用研究致力于简化接种程序,Zagreb 方案接种国产 HDCV 的临床效果研究已经在开展。美国疾病预防控制中心推荐的简易 Essen 法(1-1-1 程序或简化 4 针法)在国产 HDCV 的应用值得进一步研究。后续有关国产 HDCV 的暴露前和暴露后免疫,无论是安全性评价还是免疫原性评价及接种程序的临床应用研究都值得探索实施。

参考文献

- [1] Katz SS, Guedes F, Fernandes ER, et al. Immunological aspects of rabies: a literature review[J]. Arch Virol, 2017, 162(11): 3251-3268.
- [2] Weant KA, Baker SN. Review of human rabies prophylaxis and treatment[J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2013, 25(2): 225-242.
- [3] Bourhy H, Dautry VA, Hotez PJ, et al. Rabies, still neglected after 125 years of vaccination[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(11): 839.
- [4] 蔡勇,李声友,冯晓.人用狂犬病疫苗的发展及狂犬病防治[J].职业卫生与病伤, 2012, 27(4): 242-244.
- [5] Human rabies: 2016 updates and call for data[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2017, 92(7): 77-86.
- [6] Singh R, Singh KP, Cherian S, et al. Rabies—epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review[J]. Vet Q, 2017, 37(1): 212-251.
- [7] Tan J, Wang R, Ji S, et al. One Health strategies for rabies control in rural areas of China[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(4): 365-367.
- [8] Roumiantzeff M. The present status of rabies vaccine development and clinical experience with rabies vaccine[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1988, 19(4): 549-561.
- [9] Publication WHO. Rabies vaccines: WHO position paper—recommendations[J]. Vaccine, 2010, 28(44): 7140-7142.

- [10] WHO. WHO 立场文件[EB/OL]. [2018-04-20]. http://www.who.int/neglected_diseases/news/guidelines-and-recommendations-on-lifesaving-immunization/en/.
- [11] Wang ZX, Wang ZX. WHO position on rabies vaccine[J]. Who Drug Information, 2002(1):20.
- [12] 李岩异,戴碧璇,谭丽霞.狂犬疫苗的研究进展[J].生物产业技术, 2017(1):100-104.
- [13] 蔡勇,周蓉,李声友.国产冻干人用狂犬病疫苗(人二倍体细胞)的安全性及免疫原性观察[J].中国生物制品学杂志, 2015(5):510-517.
- [14] 赵锐,章以浩,李河民.医学生物制品学[M].北京:人民卫生出版社, 2007:445.
- [15] 汤重发,俞永新,刘景华.狂犬病病毒不同毒株的生物学特性研究[J].中国病毒病杂志, 2014(3):179-186.
- [16] 杨正时,严子林.狂犬病疫苗的发展与现状评述[J].中国微生物学杂志, 2013(2):217-222.
- [17] Wiktor TJ, Sokol F, Kuwert E, et al. Immunogenicity of concentrated and purified rabies vaccine of tissue culture origin[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1969, 131(3):799-805.
- [18] 中国食品药品监督管理局.人二倍体细胞狂犬病疫苗, 2014[EB/OL]. [2017-02-20]. <http://app1.sfda.gov.cn/datasearch/face3/base.jsp?tableId=25&tableName=TABLE25&title=%E5%9B%BD%E4%A7%E8%8D%AF%E5%93%81&bcId=124356560303886909015737447882>.
- [19] 中国食品药品监督管理局.局印发《预防用疫苗临床前研究技术指导原则》等 6 个技术指导原则[EB/OL]. [2005-10-14]. http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0055/9350_1.html.
- [20] Haylick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains[J]. Exp Cell Res, 1961(25):585-621.
- [21] 马波.人胚胎二倍体细胞株 Walvax-2 的建立、检定及应用[D]. 武汉大学, 2015:35.
- [22] 王建斌.人二倍体细胞株遗传特征的分析研究[D].昆明医科大学, 2016:56.
- [23] Stanley A, Walter A, Orenstein, Paul. Offit. 疫苗学[M].北京:人民卫生出版社, 2011:232.
- [24] 侯文礼,蔡勇,张涛.人二倍体细胞培养的狂犬病疫苗及其制备方法:中国, CN201410022611.6[P]. 2014-04-23.
- [25] Trabelsi K, Majoul S, Rourou S, et al. Development of a measles vaccine production process in MRC-5 cells grown on Cytodex1 microcarriers and in a stirred bioreactor[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(3):1031-1040.
- [26] Alirezaie B, Taqaviani M, Aghaiypour K, et al. Phenotypic and genomic analysis of serotype 3 Sabin poliovirus vaccine produced in MRC-5 cell substrate[J]. J Med Virol, 2011, 83(5):897-903.
- [27] 王月,黄思佳.现代狂犬病疫苗生产用细胞和毒种:现状和前景[J].国际生物制品学杂志, 2012, 35(5): 237-241.
- [28] Plotkin SA. Rabies Vaccine Prepared in Human Cell Cultures: Progress and Perspectives[J]. Rev Infect Dis, 1980, 2(3):433-448.
- [29] 杨晓芳,蔡勇.一种人用二倍体细胞狂犬灭活疫苗及其制备方法. CN101716341A. 中国, 200910155068.6[P]. 2012-03-21.
- [30] 侯文礼,冯晓,蔡勇.一种人二倍体细胞狂犬病疫苗及其制备方法. CN102671192A. 中国, 201210137898.8[P]. 2013-10-30.
- [31] 蔡勇,杨刚强.狂犬疫苗冻干制剂的制备方法. CN103505723A. 中国, 201310430624.2[P]. 2014-12-31.
- [32] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2010 年版[M].北京:中国医药科技出版社, 2010.
- [33] 蔡勇.冻干人用狂犬病疫苗(人二倍体细胞)的研制[G]. 2012 年中国狂犬病年会, 2012.
- [34] Centers for Disease C. Systemic allergic reactions following immunization with human diploid cell rabies vaccine[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1984, 33(14):185-187.
- [35] Dreesen DW, Bernard KW, Parker RA, et al. Immune complex-like disease in 23 persons following a booster dose of rabies human diploid cell vaccine[J]. Vaccine, 1986, 4(1):45-49.
- [36] Fishbein DB, Yenne KM, Dreesen DW, et al. Risk factors for systemic hypersensitivity reactions after booster vaccinations with human diploid cell rabies vaccine: a nationwide prospective study[J]. Vaccine, 1993, 11(14):1390-1394.
- [37] 赵凯.疫苗[M].北京:人民卫生出版社, 2017: 995.
- [38] 侯文礼,蔡勇,张涛.人二倍体细胞培养的狂犬病疫苗及其制备方法. CN103736089B. 中国. 201410022611.6[P]. 2016-04-20.
- [39] 陈盈,李丽萍.国内外儿童动物致伤研究进展[J].伤害医学(电子版), 2017, 6(1):51-62.
- [40] 许婧,周蓉.国产人二倍体细胞狂犬病疫苗用于儿童和老人的安全性观察分析[J].医学动物防制, 2016(11):1234-1237.
- [41] 闫玉英.人二倍体细胞狂犬病疫苗接种后安全性观察研究[J].预防医学情报杂志, 2018, 34(5): 636-638.
- [42] Wilde H, Glueck R, Khawplod P, et al. Efficacy study of a new albumin-free human diploid cell rabies vaccine (Lyssavac-HDC, Berna) in 100 severely rabies-exposed Thai patients[J]. Vaccine, 1995, 13(6): 593-596.
- [43] Moro PL, Woo EJ, Paul W, et al. Post-Marketing Surveillance of Human Rabies Diploid Cell Vaccine (Imovax) in the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS) in the United States, 1990-2015[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(7):4846.
- [44] Bhatia R, Ichhpujani RL, Rai Chowdhuri AN. Antibody response to human diploid cell antirabies vaccine in human volunteers—a preliminary study[J]. J Commun Dis, 1984, 16(1):70-73.
- [45] Plotkin SA, Wiktor T. Rabies vaccination[J]. Annu Rev Med, 1978 (29):583-591.
- [46] Anderson LJ, Sikes RK, Langkop CW, et al. Postexposure trial of a human diploid cell strain rabies vaccine[J]. J Infect Dis, 1980, 142(2): 133-138.
- [47] 李幸乐,李凤丽,周瑞清.一起一犬伤 13 人狂犬病暴露事件的综合处置及效果评价[J].河南预防医学杂志, 2017(1) 4-7.
- [48] Strady C, Andreoletti L, Baumard S, et al. Immunogenicity and booster efficacy of pre-exposure rabies vaccination[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2009, 103(11):1159-1164.
- [49] Vodopija R, Lafont M, Baklaic Z, et al. Persistence of humoral immunity to rabies 1100 days after immunization and effect of a single booster dose of rabies vaccine[J]. Vaccine, 1997, 15(5):571-574.
- [50] Strady A, Lang J, Lienard M, et al. Antibody persistence following preexposure regimens of cell-culture rabies vaccines: 10-year follow-up and proposal for a new booster policy[J]. J Infect Dis, 1998, 177(5):1290-1295.
- [51] Fayaz A, Simani S, Janani A, et al. Antibody persistence, 32 years after post-exposure prophylaxis with human diploid cell rabies vaccine (HDCV)[J]. Vaccine, 2011, 29(21):3742-3745.
- [52] 朱加宏,吴小红,李玉华.人二倍体细胞狂犬病疫苗免疫 8 年后加强免疫效果研究[J].中华实验和临床病毒学杂志, 2018, 32(3): 233-236.

收稿日期:2018-10-22