

肌注手足口病(EV71型)人免疫球蛋白的研制

梁小明, 周星, 何淑琴, 黄璠, 刘敏亮 (江西博雅生物制药股份有限公司, 江西抚州 344000)

摘要 [目的] 研制肌注手足口病(EV71型)人免疫球蛋白, 用以治疗重症手足口病。[方法] 以特异性血浆为原料, 采用低温乙醇法结合离子交换层析制备手足口病(EV71型)人免疫球蛋白, 对其层析条件进行优化, 制定了手足口病(EV71型)人免疫球蛋白检测的质量标准, 并对手足口病(EV71型)人免疫球蛋白相关指标进行检测。[结果] 血浆内 EV71 型中和抗体效价大于 1:60 的血浆份数占 30% 以上, 制品各项检测指标符合制定的质量标准。[结论] 可直接从自然感染的手足口病的供血浆员中筛选出抗 EV71 型高效价血浆, 制备手足口病(EV71型)人免疫球蛋白。

关键词 手足口病; 免疫球蛋白; 肠道病毒 71 型

中图分类号 S855.99 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)20-08805-03

Preparation of Human Enterovirus 71 Immunoglobulin for Intramuscular Injection

LIANG Xiao-ming et al (Jiangxi Boya Biopharmaceutical Co. Ltd., Fuzhou, Jiangxi 344000)

Abstract [Objective] To prepare of Human Enterovirus 71 Immunoglobulin for intramuscular injection so as to treat hand-foot-mouth disease. [Method] Human Enterovirus 71 Immunoglobulin was prepared from the specific plasma, used low-temperature ethanol process and ion-exchange chromatography. [Result] Of the total 939 plasma samples tested, 288 (30.67%) were with the antibody titer greater than 1:60. All testing indicators of the quality standard of human enterovirus 71 immunoglobulin were tested and the results showed the testing indicators were in line with the quality standard. [Conclusion] It's practicable to prepare of Human Enterovirus 71 Immunoglobulin derived from healthy blood donors who were be naturally infected with Enterovirus 71.

Key words Hand-foot-mouth disease; Immunoglobulin; Enterovirus 71

手足口病(Hand-foot-mouth disease, HFMD)是世界性的传染病, 全世界大部分地区均有发生。1972 年, 美国、澳大利亚、孟加拉等国家爆发中枢神经系统感染疾病, 科学家从患者中首次分离出 EV71 病毒, 并确认其为 HFMD 的致病源^[1-2]。我国于 1980 年在广州首次报道 1 例手足口病, 病例为 1 个 5 岁男童, 发病 6 d 后痊愈^[3]。2008 年 3 月, 安徽省阜阳市爆发了由 EV71 引起的手足口病疫情^[4], 疫情迅速扩散至我国多个省市。2008 年 5 月 2 日, 卫生部将 HFMD 列入《中华人民共和国传染病防治法》中的丙类传染病, 并要求各地加强对 HFMD 的监测和报告, 并需要通过国家疾病监测管理直报系统及时上报疫情信息。

目前, 手足口病的治疗主要以对症治疗为主, 尚无疫苗及特异、高效的抗病毒药物。研究表明, 可直接从自然感染的手足口病的供血浆员中筛选出抗 EV71 型高效价血浆^[5-10]。笔者立足于高滴度 EV71 中和抗体的健康人血浆筛选及制备工艺的研究, 旨在制备高效价手足口病抗体(EV71 型)免疫球蛋白, 以有效治疗重症 EV71 型手足口病, 缓解手足口病的用药紧张。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 健康人血浆, 为江西博雅生物制药股份有限公司产品; 横纹肌瘤(Rhabdomyosarcoma, RD)细胞, 由中国食品药品检定研究院提供; EV71. C4 亚型, 由中国食品药品检定研究院提供; DMEM 培养液, 购自 GIBCO 公司; 胎牛血清, 购自 GIBCO 公司。

1.2 主要仪器与设备 600/100-300 层析系统(GE 公司); PHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); DDS-308 型

电导率仪(成都世纪方舟科技有限公司); DM3000 倒置荧光显微镜(莱卡公司)。

1.3 血浆筛查试验

1.3.1 细胞维持液的配制。取一定量的 DMEM 基础培养液, 加入 2% 的胎牛血清, 即配成细胞维持液。

1.3.2 细胞悬液的制备。将对数生长期的人横纹肌肿瘤细胞(RD)细胞稀释至浓度为 1×10^5 个/ml 的细胞悬液。

1.3.3 病毒悬液的制备。根据病毒的滴度(细胞培养半数感染量, 即 $CCID_{50}$), 使用细胞维持液将 EV71 病毒稀释至 $100CCID_{50}$ 左右。

1.3.4 病毒回滴。取 96 孔细胞培养板, 每孔加入 50 μ l 细胞维持液, 将攻击病毒液 10 倍类比稀释至 10^{-4} , 各取 50 μ l 按标记转移至病毒回滴孔, 另做 1 个阴性对照组。将细胞培养板置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的二氧化碳培养箱培养 2 h。

1.3.5 血浆筛查。将处理好的血浆样品接种于含病毒的 96 孔细胞培养板中, 中和一段时间后接种细胞悬液, 采用细胞病变抑制法^[11]筛查血浆中的 EV71 中和抗体。

1.3.6 血浆筛查方法的验证。随机在中和效价大于、等于和小于 1:60 的血浆样品中各取 1 份, 编号分别为 1、2、3, 进行中和效价测定。根据 Karber 法计算血浆中中和抗体滴度, 验证该方法的重复性。

1.4 肌注手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白的制备 以高效价抗-EV71 中和抗体活性的健康人血浆作为原料, 采用低温乙醇法结合阴离子离子交换层析, 经低 pH 孵放及纳米膜过滤灭活去除病毒, 制备手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白。

1.5 药效评价及质量检测

1.5.1 药效评价。采用细胞病变抑制法, 以“EV71 抗体效价”作为评价手足口病人免疫球蛋白药效性的指标。

1.5.2 质量检测。手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白作为

基金项目 863 计划项目(2012AA021903)。

作者简介 梁小明(1967-), 男, 江西抚州人, 高级工程师, 硕士, 从事药物研发, E-mail: vivian0817@aliyun.com。

收稿日期 2013-06-26

一类新药,国内外尚无产品面世,也未被纳入《中国药典》,需自行建立药品质量标准进行检测。手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白属于特异性免疫球蛋白,其检测标准可参照 2010 版《中国药典》中乙型肝炎免疫球蛋白和狂犬病免疫球蛋白检测标准;同时,增加“EV71 抗体效价”作为评价手足口病人免疫球蛋白有效性的指标,增加“抗-HCV”及“抗-HIV(1+2)”作为评价手足口病人免疫球蛋白病毒安全性的指标。

2 结果与分析

2.1 血浆筛查试验结果 我国健康人群的手足口病感染率非常高。由表 1 可知,939 份血浆中 EV71 型中和抗体效价大于 1:60 的血浆份数占 30% 以上。此次 EV71 型中和抗体血浆筛选结果表明,在无手足口病疫苗可供免疫的情况下,可直接从自然感染的手足口病的供血浆员中筛选出抗 EV71 型高效价血浆,进一步验证了手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白制备的可行性。

表 1 手足口病(EV71 型)血浆抗体中和效价测定结果

中和效价	数量	比例//%
>1:60	288	30.67
1:60	177	18.85
<1:60	474	50.48

2.2 血浆筛查方法验证结果 由表 2 可知,血浆中和抗体滴度试验得到的结果与血浆筛查试验基本相符,虽然样本 2

和样本 3 测定结果的变异系数大于 20%,但对于细胞学检测方法,特别是用于大样本筛查,该方法的重复性能够满足实际工作要求。由此可见,血浆中抗 EV71 抗体中和效价越高,其 RSD 值较小,说明其精确度较高。因此,该方法对筛查血浆中 EV71 型中和抗体效价方法具有可行性。

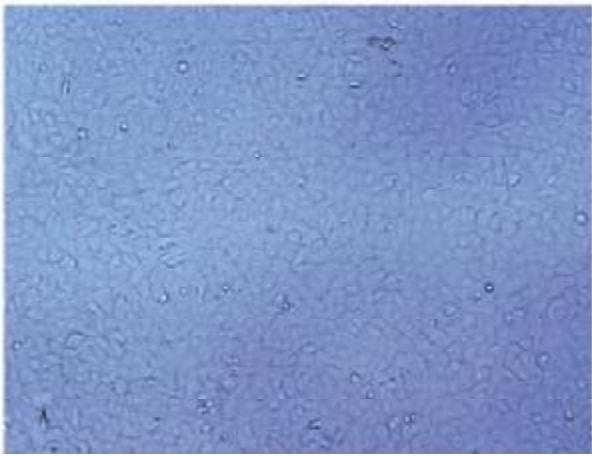
表 2 血浆筛选方法的验证结果

血浆样品	血浆中和效价(1: X)						均值	标准偏差(SD)	相对标准偏差(RSD) %
1	138	146	152	140	136	173	147.50	13.79	9.36
2	52	49	70	39	68	46	54.00	12.41	22.96
3	12	9	17	12	16	11	12.83	3.06	23.85

2.2 肌注手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白的制备 参照江西博雅生物制药股份有限公司乙型肝炎免疫球蛋白的工艺规程,以抗体中和效价≥60 的血浆的高效价 EV71 特免血浆为原料,采用低温乙醇法结合阴离子离子交换层析分离纯化手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白,同时优化层析工艺条件,制备出高纯度的手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白。

2.3 药效评价及质量检测结果

2.3.1 药效评价结果。从图 1 可以看出,受到人免疫球蛋白保护的 RD 细胞正常生长,而受到 EV71 病毒侵染后的 RD 细胞发生病变,细胞皱缩变圆,折光性变强。



注:A 为受到人免疫球蛋白保护的 RD 细胞;B 为受到 EV71 病毒侵染后的 RD 细胞。

图 1 受到手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白保护的 RD 细胞与受到 EV71 型病毒侵染后的 RD 细胞对比

经计算,病毒滴度为 1.58 CCID₅₀/μl,3 次测定得到的手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白中和抗体滴度分别为 1:2 700、1:2 619 和 1:2 351,取平均值,即手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白中和抗体滴度为 1:2 557,说明将稀释度为 1:2 557 的手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白可保护 50% 细胞不产生病变,与特异性原料血浆中中和抗体水平基本相符。

2.3.2 质量检测结果。从表 3 可以看出,手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白各项检测指标符合制定的质量标准。

3 讨论

笔者以高滴度 EV71 中和抗体的健康人血浆为原料,采用低温乙醇法结合离子交换层析制备手足口病(EV71 型)人

免疫球蛋白,采用低 pH 孵放及纳米膜过滤灭活去除病毒,建立检测的质量标准,并对其药效性进行评价。作为 1 种国内外尚未面世的新药,手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白对手足口病的治疗具有良好的治疗效果及广阔的市场前景与社会效益。此次手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白的研制成功,可为其工业化大规模生产提供理论和技术依据。

另外,该新产品成功研制也面临着更大的挑战:原材料为含高滴度 EV71 中和抗体的健康人血浆,由于来源的特殊性及国家监管,造成手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白原料的稀缺性;受到高效价血浆来源的限制,手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白短期内还难以进行大规模生产和临床应用。

表 3 质量标准和检测结果

检测指标	检测标准	检测结果
鉴别试验(一)	仅与抗人血浆或血清产生沉淀线,与抗牛、抗马、抗猪、抗羊血浆或血清不产生沉淀线	仅与抗人血浆或血清产生沉淀线,与抗牛、抗马、抗猪、抗羊血浆或血清不产生沉淀线
鉴别试验(二)	与正常人血清或血浆比较,主要沉淀线应为 IgG	与正常人血清或血浆比较,主要沉淀线应为 IgG
外观	应为无色或淡黄色澄明液体,可带乳光,不应出现浑浊	为无色澄明液体,带乳光,样品无浑浊现象。
可见异物	应无玻璃屑、金属屑、纤维、色点、色块等明显可见异物	无玻璃屑、金属屑、纤维、色点、色块等明显可见异物
装量	不少于 2 ml	2 ml
热稳定性	(57±0.5)℃水浴 4 h,肉眼观察应无凝胶化或絮状物	水浴 4 h 后检测发现无凝胶化或絮状物出现
pH	pH 应为 6.6~7.2	pH 为 7.1
蛋白质浓度	应不高于 180 g/L	122 g/L
EV71 抗体效价	抗体滴度应不低于 1:2 048	1:2 557
免疫球蛋白纯度	不低于蛋白质总量的 95.0%	99.60%
麦芽糖含量	不高于 50 g/L	0.5 g/L
甘氨酸含量	10~30 g/L	24 g/L
分子大小分布	IgG 单体与二聚体含量之和≥92.0%	IgG 单体与二聚体含量之和为 99.5%
抗-HBs 效价	≥1.0 IU/g 蛋白质	7.3 IU/ml
无菌检查	应无菌生长	无菌生长
异常毒性检查	应符合要求	符合要求
热原检查	无热原反应	符合要求
抗-HCV	酶联法,应为阴性	阴性
抗-HIV(1+2)	酶联法,应为阴性	阴性

根据《中国药典》2010 年版 3 部中特异性免疫球蛋白的质量标准,已经初步建立了《手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白质量标准》,但作为一类新药,尚未被纳入《中国药典》及其他国家药典,属于尚未在国内外上市销售的生物制品,质量标准有待进一步完善和提高。

从几批手足口病(EV71 型)人免疫球蛋白产品试制情况来看,通过简化优化工艺后,产品收率有了一定的提升,由于受手足口病抗体血浆数量的限制,尚未进行进一步的批量及批次验证。

参考文献

[1] 袁奋,阮红.手足口病流行病学及其防治研究进展[J].地方病通报,2009,24(5):92-93.
[2] 王晓华.手足口病 1 698 例[J].中华传染病杂志,2002,20(4):246-247.
[3] 吕元聪.手足口病研究新进展[J].应用预防医学,2008,14(6):189-

192.
[4] 王连森.手足口病流行病学及病原学研究[D].济南:山东大学,2009.
[5] 侯继锋,孙思才,王敏力,等.微量细胞病变法检测原料血浆中肠道病毒 71 型中和抗体水平[J].中国生物制品学,2011,24(7):857-858.
[6] 毛群颖,郝春生,张霞,等.人免疫球蛋白中肠道病毒 71 型中和抗体效价的测定[J].微生物学免疫学进展,2010,38(1):18-21.
[7] XU W, LIU CF, YAN L, et al. Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications[J]. Virology, 2012(9):1-8.
[8] YANG C F, DENG C Y, WAN J F, et al. Neutralizing antibody response in the patients with hand, foot and mouth disease to enterovirus 71 and its clinical implications[J]. Virology, 2011(8):306-314.
[9] 郭中平.特异性人免疫球蛋白及其临床应用和开发前景[J].国际生物制品学杂志,2006,29(1):19-21.
[10] 张战,鲍洁,杨海峰.特异性人免疫球蛋白及其临床应用[J].中国输血杂志,2005,18(4):345-347.
[11] 张佩,吴恩应,陈玉琴,等.特异性抗体效价检测技术概述[J].现代生物医学进展,2011,11(17):3377-3379.

(上接第 8798 页)

[6] COKER J A. Biochemical characterization of a β -galactosidase with a low temperature optimum obtained from an antarctic arthrobacter isolate[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185: 5478-5482.
[7] TRIMBUR D E. Characterization of a psychrotrophic arthrobacter gene and its cold-active β -Galactosidase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60: 4544-4552.
[8] YUJI FUJIMOTO, RYOKO IKEHATA. Purification and molecular characterization of cold-active β -galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2 [J]. Appl Microbiol Biotechnol Springer-Verlag, 2006, 72(4): 720-725.

[9] NAKAGAWA T, IKEHATA R, TOMIZUKA N. Over expression and functional analysis of cold-active β -Galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2[J]. Protein Expression and Purification, 2007, 54: 295-299.
[10] TURKIEWICZ M, KUR J, BIALKOWSKA A, et al. Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b as a source of cold-adapted β -Galactosidase[J]. Biomolecular Engineering, 2003, 20: 317-324.
[11] JEONG-WON P, YONG-SIK O, JAI-YUN L, et al. Isolation and characterization of cold-adapted strains producing β -Galactosidase[J]. The Journal of Microbiology, 2006, 44: 396-402.