

· 技术研究 ·

一种新型胃癌治疗性疫苗的无菌检查

毕华, 刘兰, 范文红, 史新昌, 丁有学*, 饶春明* (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 建立一种新型胃癌治疗性疫苗的无菌检查方法。方法: 依据《中国药典》2015年版三部要求, 采用薄膜过滤法和吐温80溶解及梯度冲洗的方法进行无菌检查并进行方法适用性试验。结果与结论: 通过方法适用性试验说明建立的无菌检查法适用于该疫苗的无菌检查, 并对其他黏性供试品的无菌检查具有借鉴意义。

关键词: 胃癌治疗性疫苗; 无菌检查; 薄膜过滤; 方法学验证

中图分类号: R927.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)02-0221-04
doi:10.16153/j.1002-7777.2018.02.011

Sterility Test of a Novel Gastric Cancer Therapeutic Vaccine

Bi Hua, Liu Lan, Fan Wenhong, Shi Xinchang, Ding Youxue*, Rao Chunming* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish a method for sterility test of a novel gastric cancer therapeutic vaccine. **Methods:** Membrane filtration method and the method of Tween 80 dissolution and gradient washing were used for sterility test and applicability test according to the relevant requirements of the *Chinese Pharmacopoeia* 2015 edition, volume III. **Results and Conclusion:** The applicability test showed that the established method was suitable for sterility test of this vaccine and of reference significance to that of other viscosity samples.

Keywords: gastric cancer therapeutic vaccines; sterility test; membrane filtration; method validation

一种新型胃癌治疗性疫苗是由胃泌素多肽G18和ProG分别通过交联剂eMCS [6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯]与载体蛋白TT(破伤风类毒素原液)结合,并按1:1(W/W)混合后与混合油相经高剪切分散制备而成。该疫苗以胃泌素生长因子为明确靶点,利用“表位肽载体偶联”和“新型佐剂”技术,是一种用于肿瘤主动免疫治疗的“新型抗胃泌素—胃癌治疗性疫苗”。前期的试验证明,动物接受免疫后能够诱导机体产生大量特异性、高亲和力的中和抗体,阻断胃泌素的终产物以及前体激素,从而有效地抑制人胃癌细胞的生长。可用于

胃癌患者术后及恶性肿瘤的复发和转移,并延长患者的存活时间,提高生存质量,具有广阔的临床应用前景^[1-3]。

该治疗性疫苗的一个显著特点是将佐剂直接加入到制剂中,有别于其他制剂与佐剂分开,临用前再混合的疫苗^[4-5]。该疫苗在使用时直接注射,使用非常方便。但因为佐剂的加入,使得制剂呈白色乳液或略分层的状态,粘度高,给该制品的质量控制带来了一定困难。特别是无菌检查,目前《中国药典》2015年版三部的无菌检查方法主要包括薄膜过滤法和直接接种法,该制品粘度高,按一般的

作者简介: 毕华, 副研究员; Tel: (010) 67095684; E-mail: bihua@nifdc.org.cn

通信作者: 丁有学; Tel: (010) 67095684; E-mail: dingyouxue@nifdc.org.cn

饶春明; Tel: (010) 67095380; E-mail: raoem@nifdc.org.cn

薄膜过滤法不能过膜；而直接接种法，不仅样品本身不易吸取，且接种后颜色不易判断^[6]。本研究根据该制品自身特点建立了一种薄膜过滤无菌检查方法，有效地解决了其无菌检查的难题，同时对同类及相关制品的无菌检查也有借鉴意义。

1 材料与设备

1.1 培养基及试剂

硫乙醇酸盐流体培养基、胰酪大豆胨液体培养基、沙氏葡萄糖液体培养基、pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液均购自北京三药科技开发公司；沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基由中国食品药品检定研究院（以下简称本院）培养基室提供；标准比浊管由本院结核病疫苗室提供；0.9%氯化钠注射液（石家庄四药有限公司）；聚山梨酯80为SIGMA公司产品；浓度为20%、10%、1%、0.1%及0.05%（W/V）的无菌聚山梨醇酯80水溶液为本实验室自制。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）[CMCC (B) 26003]、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）[CMCC (B) 10104]、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）[CMCC (B) 63501]、生孢梭菌（*Clostridium sporogenes*）[CMCC (B) 64941]、白色念珠菌（*Candida albicans*）[CMCC (F) 98001]、黑曲霉（*Aspergillus niger*）[CMCC (F) 98003]，均来自中国食品药品检定研究院国家菌种保藏中心。

1.3 供试品

胃癌治疗性疫苗，批号20140926，为企业送检样品。

1.4 设备

无菌隔离仓，生物安全柜，超净工作台，生化培养箱（20~25℃、30~35℃），高压灭菌器。

2 方法

2.1 菌液的制备

按照《中国药典》^[6]2015版三部的无菌检查薄膜过滤法，分别接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物200 μL至10 mL胰酪大豆胨液体培养基中，接种生孢梭菌的新鲜培养物200 μL至10 mL硫乙醇酸盐流体培养基中，30~35℃培养18~24 h；接种白色念珠菌的新鲜培养物200 μL至10 mL沙氏葡萄糖液体培养基中，20~25℃培养24~48 h，上述培养物用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液配制制成每1 mL含菌数小于100 cfu

的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物200 μL至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基上，20~25℃培养5~7 d，加入3~5 mL无菌的含0.05%（mL/mL）聚山梨酯80的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液，将孢子洗脱，然后，吸出孢子悬液至无菌试管内，用含0.05%（mL/mL）聚山梨酯80的pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液制成每1 mL含孢子数小于100 cfu的孢子悬液。细菌计数可采用比浊法^[7]，与标准比浊管对照，根据中国细菌浊度标准使用说明书参考菌数表将菌液稀释。同时进行平板计数。

2.2 方法适用性试验^[8-10]

2.2.1 试验组

取胃癌治疗性疫苗供试品（批号：20140926）10支，全部转移至100 mL 20%（mL/mL）无菌聚山梨酯80水溶液中，充分混匀，使供试品完全溶解，保证供试品的均一性，作为供试液，同法制备供试液2瓶。取一次性全封闭三联集菌器一套，按薄膜过滤法过滤，依次用20%、10%、1%、0.1%、0.05%的无菌聚山梨酯80水溶液冲洗，每个浓度每次100 mL，最后用0.9%氯化钠注射液冲洗一次，总冲洗量500 mL。冲洗完毕后3管均加入硫乙醇酸盐流体培养基100 mL。另取三联培养器一套，按上述方法过滤并冲洗后，3管中均加入胰酪大豆胨液体培养基100 mL。将上述6管培养器转移至阳性菌操作间，在生物安全柜中接种阳性菌。于装有硫乙醇酸盐流体培养基的培养器中分别接入小于100 cfu的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌菌液各1 mL，于装有胰酪大豆胨液体培养基的培养器中分别接入小于100 cfu的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌液1 mL。将接种了金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌菌液、枯草芽孢杆菌菌液的培养器置30~35℃培养箱，将接种了白色念珠菌、黑曲霉菌液的培养器置20~25℃培养箱，分别培养3~5 d，逐日观察各管内试验菌的生长情况。

2.2.2 阳性对照组

取一次性全封闭三联集菌器2套，一套灌入硫乙醇酸盐流体培养基100 mL，另一套灌入胰酪大豆胨液体培养基100 mL，按“2.2.1”节中操作，将6种菌液分别接种到相应的培养基中，作为阳性对照。分别培养3~5 d，逐日观察各管内试验菌的生长情况。

2.2.3 阴性对照组

取一次性全封闭三联集菌器1套，滤过0.9%氯化钠注射液100 mL，2管灌入硫乙醇酸盐流体培养基100 mL，1管灌入胰酪大豆胨液体培养基100 mL，其中1管硫乙醇酸盐流体培养基放置30~35℃，另1管与胰酪大豆胨液体培养基共同放置20~25℃培养14 d，并逐日观察结果，作为阴性对照。

2.3 供试品无菌检查

供试品供试液的配制同方法适用性试验。取一次性全封闭三联集菌器1套，按方法适用性试验滤过供试液，用不同浓度的无菌聚山梨酯80水溶液及0.9%氯化钠注射液冲洗各100 mL后，其中2管灌入硫乙醇酸盐流体培养基，1管灌入胰酪大豆胨液

体培养基100 mL，同时做阴性对照。其中1管硫乙醇酸盐流体培养基放置30~35℃，另1管与胰酪大豆胨液体培养基共同放置20~25℃培养14 d，并逐日观察结果。

2.4 阳性对照

供试品无菌检查培养14 d后，若为无菌生长，取30~35℃培养的硫乙醇酸盐流体培养基做阳性对照。接入小于100 cfu 的金黄色葡萄球菌1 mL，置30~35℃培养48~72 h，观察细菌生长情况。

3 结果

3.1 菌液制备结果

各菌液经相应条件培养后，细菌生长状态良好，平行板计数结果见表1。

表 1 细菌计数结果

菌种名称	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	生孢梭菌	白色念珠菌	黑曲霉
稀释度	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
计数结果 / (cfu · mL ⁻¹)	78	65	56	63	37	45

3.2 方法适用性试验结果

方法适用性试验各试验管经相应培养条件培养后结果见表2。从表2结果可以看出，各供试品组与阳性对照组细菌生长状态良好，速度一致，金黄色葡萄球菌等4菌株组均在24 h即可观察到细菌生

长，白色念珠菌和黑曲霉两组细菌生长较慢，各培养瓶均在第2天可以观察到细菌生长，说明该条件下供试品无抑菌作用或抑菌成分可忽略不计，可用于该胃癌治疗性疫苗的无菌检查。

表 2 方法学验证结果

试验菌名称	阳性对照组			供试品组		
	1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d
金黄色葡萄球菌	+	+	+	+	+	+
铜绿假单胞菌	+	+	+	+	+	+
枯草芽孢杆菌	+	+	+	+	+	+
生孢梭菌	+	+	+	+	+	+
白色念珠菌	-	+	+	-	+	+
黑曲霉	-	+	+	-	+	+
阴性对照	-	-	-	-	-	-

3.3 无菌检查结果

无菌检查实验经14 d培养后，阴性对照组与供试品均无菌生长，阳性对照经3 d培养细菌生长良好。

4 讨论

在近几年药品检验技术的发展中，薄膜过滤法已经受到越来越多的关注和应用，其不但具有操作简单、快速、数据准确的特点，而且可以消除药

品中抗菌成分对无菌检查的干扰作用,同时可以和多种方法联合,使一些难溶型、剂型复杂的药品易溶,从而能够更适用于薄膜过滤法。可以说薄膜过滤法在最大程度上减少了外界的影响,同时增加了样本的取样量。因此,这种方法更加客观、公正、科学。

《中国药典》2015年版三部无菌检查法保留了硫乙醇酸盐流体培养基与胰酪大豆胨液体培养基接种支数2:1并将硫乙醇酸盐流体培养基分两个不同温度培养的要求,其余内容与其它各部统一,解决了2010年版《中国药典》无菌检查项各部之间方法相同但要求不一致的问题,使实验操作更加明确^[11-12]。

无菌是无菌药品的基本要求,无菌检查合格与否不仅反映产品的质量属性,更是其生产工艺及过程控制中无菌保障的反映。所以无菌检查是无菌药品质量控制的首要项目,可以说,无菌药品的无菌检查不合格,则其他质量属性无从谈起。随着现代生物技术的不断发展,有越来越多的品种和剂型被广泛应用于临床治疗中,也将有更多新型佐剂应用于生物制品中,剂型和成分的多样化使无菌检查方法更加复杂,也给药品检验工作提出了更高的要求。新型佐剂以油/水乳剂型应用较多,主要包括油包水或水包油型乳化剂,如MF59、AS02、Montanide等^[13-14]。本研究中的胃癌治疗性疫苗就属于无菌注射型油包水乳制剂,是载体偶联多肽疫苗与油包水佐剂的混合物。在选择稀释剂的时候,首先要考虑其是否具有抑菌性,聚山梨酯80由于其分子中有较多的亲水性基团——聚氧乙烯基,故亲水性强,为一种非离子型去污剂。常作为乳化剂;可与其他乳化剂如月桂醇硫酸钠或司盘类合用,能增加乳剂的稳定性。也可作某些药物的增溶剂^[15]。本身不具有抑菌性,所以,本研究中确定用聚山梨酯80作为稀释剂,分别用5%、10%、15%(v/v)浓度对供试品进行稀释,供试液均不能有效地通过滤膜,最终确定用20%聚山梨酯80作为稀释剂,配制的供试品可完全有效地通过滤膜,再分别用10%、1%、0.1%、0.05%聚山梨酯80水溶液冲洗,最后用0.9%氯化钠注射液冲洗5次,总冲洗量500 mL。以保证供试品完全过膜。本研究建立的针对黏性供试品的吐温80系列梯度稀释法扩大了薄膜过滤法的应用

范围,对油包水或水包油性制剂及其他黏性供试品具有借鉴意义。

参考文献:

- [1] Qing He, Hua Gao, Meng Gao, et al. Anti-Gastrins Antiserum Combined with Lowered Dosage Cytotoxic Drugs to Inhibit the Growth of Human Gastric Cancer SGC7901 Cells in Nude Mice[J]. Journal of Cancer, 2015, 6 (5): 448-456.
- [2] Zhou JJ, Chen ML, Zhang QZ, et al. Blocking Gastrin and CCK-B Autocrine Loop Affects Cell Proliferation and Apoptosis in Vitro[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 343 (1-2): 133-141.
- [3] Burkitt MD, Varro A, Pritchard DM. Importance of Gastrin in the Pathogenesis and Treatment of Gastric Tumors[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15 (1): 1-16.
- [4] 杨帆帆, 雪菲群, 王霄旻. 疫苗佐剂的研究发展和前景展望[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18 (5): 79-84.
- [5] 张洁. 疫苗佐剂及其临床前和临床研究要点[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21 (10): 925-928.
- [6] 中国药典: 三部[S]. 2015: 通则1101.
- [7] 纪绍梅, 严德喜. 微生物培养基质控与图解[M]. 北京科学技术出版社, 2006.
- [8] 王似锦, 高春. 疫苗类制品无菌检查方法(薄膜过滤法)的研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31 (8): 1556-1559.
- [9] 丁有学, 刘兰, 毕华, 等. 碱性成纤维细胞生长因子凝胶的无菌检查[J]. 中国药事, 2013, 27 (9): 932-934.
- [10] 张国林. 艾迪注射液薄膜过滤无菌检查法的建立及验证[J]. 抗感染药学, 2014, 11 (4): 298-301.
- [11] 中国药典: 二部[S]. 2010: 附录107-116.
- [12] 中国药典: 三部[S]. 2010: 附录89.
- [13] 方鑫, 梁争论. 人用疫苗佐剂作用机制的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28 (8): 866-870.
- [14] 周洋, 耿兴超, 汪巨峰, 等. 疫苗佐剂最新研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22 (1): 34-42.
- [15] 于丽娜, 孙会敏, 杨锐, 等. 功能性辅料的发展和应用[J]. 中国药事, 2013, 27 (6): 628-634.

(收稿日期 2017年2月6日 编辑 邹宇玲)